

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Patrícia Felipe Cardoso

"RESPOSTA DE *Crotalaria juncea* à EXPOSIÇÃO AO NÍQUEL"

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética Vegetal
e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Campinas - SP
2005

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP C179r
V	EX
TOMBO BCI	64490
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	22/06/05
Nº CPD	B.11.10.35431G

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C179r

Cardoso, Patrícia Felipe

Resposta de *Crotalaria juncea* à exposição ao Níquel / Patrícia Felipe
Cardoso. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Ricardo Antunes de Azevedo
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Aminoácidos. 2. Crotalaria. 3 Enzimas. 4. Níquel. 5. Poluição.
I. Azevedo, Ricardo Antunes de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 30 de maio de 2005.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo(Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Silvia Maria Guerra Molina

Assinatura

Prof. Dr. Gerhard Bandel

Assinatura

Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar

Assinatura

Prof. Dr. Lyndel Wayne Meinhardt

Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorrelo

Assinatura

*Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.
(Gonçalves Dias)*

*Ao meu Pai Elisiario, pelo amor, por sua dedicação a minha formação,
pela constante alegria e sorrisos compartilhados.
Ao meu melhor amigo,*

Minha Homenagem.

*...Não foi assim com as histórias que realmente importaram,
ou aquelas que ficam na memória.
As pessoas parecem ter sido simplesmente embarcadas nelas, geralmente
seus caminhos apontavam naquela direção, como se diz.
Mas acho que eles tiveram um monte de oportunidades, de dar as costas,
apenas não o fizeram.
E, se tivessem feito, não saberíamos, porque eles seriam esquecidos.
Ouvimos sobre aqueles que simplesmente continuaram.
(J.R.R. Tolkien)*

*A minha mãe Rosalva, pelo amor, por sua dedicação a minha formação e
por compreender a minha ausência para realização deste trabalho.
A minha avó Anna, pelo apoio e amor.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e minha vida.

A Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", especialmente ao Departamento de Genética, pelo espaço concedido para a realização deste trabalho.

A UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Prof.Dr. Ricardo Antunes Azevedo, pela orientação em todos esse anos.

A Profa.Dra. Maria Flor do Céu Araújo Moura, pela orientação na graduação, conhecimentos transmitidos e amizade.

A Profa.Dra. Silvia Maria Guerra Molina, pela contribuição na execução das análises estatísticas e pela amizade.

Ao Capelão Militar Vítor Tome Menuti, por suas palavras que infudiram em meu coração sentimentos profundos de fé e de sabedoria.

A Minha Família, pela alegria e união em todos os momentos.

As velhas amigas, Fernanda. G. N. V. Ciavatta e Gabriela C. Mansfield, com as quais sempre pude contar, apesar da distância.

A Claudio Yuji Tsutsumi, Guy Mitsuyuki Tsumanuma, Adalgisa R. Torres, Barbara M. Padovan, Kerlyng Cecchini, Luciana C. Santos e Monica S. Camargo, pela amizade formada nesse período de nossas vidas em Piracicaba.

A Todas PensioGirls, pela companhia em todos os momentos.

A Família Alcarde, pelos laços de amizade que tornaram essa jornada em Piracicaba mais leve.

A Guilherme José G. Pereira, Alejandro Alberto Toro, Carlos Alberto Moldes, Leandro F. Aguiar, Rui Alberto G. Júnior, Ana Cristina P. Gomes, Ligia A. Medeiros e Liliane S. Camargos, pela amizade, incentivo e por toda ajuda prestada durante o período de realização deste trabalho.

A Ademir Sérgio Ferreira Araújo, Adriano Schiavinatto,, Fernando César B. Zambrosi, Fernando Enrique N. Cardenas, Frederico P. Matta, Gilberto Ken-iti Yokomizo, Paulo A. Araújo, Raul S. Almeida, Ricardo Yara, Vanderlei A. Varisi, Vanderlei S. Santos, Ana Luiza Ramos, Andréa Miltteman, Caroline M. Wagner e Eulália S. S. Hoogerheide, por todos momentos compartilhados durante todo esse período de nossas vidas em Piracicaba.

Aos Companheiros do Laboratório, pelo convívio durante a realização deste trabalho.

Aos Funcionários da ESALQ, Carlos Alberto Macedônio, Fernando Leopoldino, Oberdan, Neuza Maria S. Rocha e Silvania M. Gregório, por terem sido tão atenciosos.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Viver, e não ter a vergonha de ser feliz.

Cantar e cantar e cantar.

A beleza de ser um eterno aprendiz.

Ah, meu Deus, eu sei, eu sei

Que a vida deveria ser bem melhor e será

Mas isso não impede que eu repita.

É bonita, é bonita e é bonita..

(Gonzaguinha).

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELA E FIGURAS	x
LISTA DE SIGLAS ,ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xii
1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1-Efeito Tóxico do Níquel	3
2.1.1-Importância da <i>Crotalaria juncea</i>	6
2.1.2-Aminoácidos	6
2.1.3-Sistemas detoxificadores de espécies ativas de oxigênio	9
2.1.4-Superóxido Dismutase	12
2.1.5-Catalase	14
2.1.6-Glutathione Redutase	16
2.1.7-Fitoquelatina	19
3-MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1-Cultivo do material biológico	21
3.1.1-Experimento1. alterações bioquímicas	22
3.1.2-Experimento 2. análise de aminoácidos solúveis	22
3.1.3-Experimento 3. análise da concentração de NiCl ₂ nos tecidos vegetais	23
3.2-Cromatografia em camada delgada	23
3.3-Determinação das atividades das enzimas anti-oxidantes	24
3.3.1-Atividade da CAT	24
3.3.2-Atividade da SOD	25
3.3.3-Characterização das isoenzimas da SOD	26
3.3.4-Atividade da GR	26
3.4-Determinação de proteínas	27
3.5-Eletroforese de proteínas totais	27
3.6-Determinação dos aminoácidos solúveis por espectrofotômetro	28
3.7-Determinação da concentração de NiCl ₂ nos tecidos vegetais de plantas tratadas	28
3.8-Peroxidação de lipídeos	29
4-ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1-Considerações Gerais	31
5.2-ARTIGO-1	33
5.2-ARTIGO-2	47

5.3-Análise da concentração de Ni nos tecidos vegetais das plantas	71
5.4-Análises bioquímicas	81
6-CONCLUSÕES	109
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELA E FIGURAS

	Página
Tabela 1. Família de aminoácidos relacionados com os precursores metabólicos.	8
Figura 1. Via de biossíntese de aminoácidos.	7
Figura 2. Esquema da via de compartilhização de EAOs.	12
Figura 3. Esquema da reação catalisada pela SOD.	13
Figura 4. Esquema da reação catalisada pela CAT.	14
Figura 5. Esquema da reação catalisada pela GR no ciclo da Glutathiona Ascorbato.	17
Figura 6. Quantidade de Fe acumulado na parte aérea de plântulas de crotalaria em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	98
Figura 7. Quantidade de Fe acumulado em raízes de plântulas de crotalaria em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	100
Figura 8. Quantidade de Zn acumulado em na parte aérea de plântulas de crotalaria em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	102
Figura 9. Quantidade de Zn acumulado em raízes de plântulas de crotalaria em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	104
Figura 10. Análise de histina e prolina na parte aérea de plântulas de crotalaria em T.L.C, em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	108
Figura 11. Análise de histidina e prolina em raízes de plântulas de crotalaria em T.L.C, em função da aplicação de diferentes doses de Ni.	109
Figura 12. Atividade específica SOD na parte aérea de plântulas de crotalaria submetidas a diferentes doses de Ni.	113
Figura 13. Atividade específica SOD em raízes de plântulas de crotalaria submetidas diferentes doses de Ni	115
Figura 14. Atividade de SOD determinada em PAGE não-desnaturante na parte aérea de plântulas de crotalaria submetidas a dose 0,05 mM de NiCl ₂ .	118
Figura 15. Atividade de SOD determinada em PAGE não-desnaturante em raízes de plântulas de crotalaria submetidas a dose 0,05 mM de NiCl ₂	119
Figura 16. Atividade de SOD determinada em PAGE não-desnaturante na parte aérea de plântulas de crotalaria submetidas a dose 0,5 mM de NiCl ₂ .	120
Figura 17. Atividade de SOD determinada em PAGE não-desnaturante em raízes de plântulas de crotalaria submetidas a dose 0,5 mM de NiCl ₂ .	121
Figura 18. Isoformas de SOD em raízes de plântulas de crotalaria determinada em PAGE não-desnaturante.	124
Figura 19. Isoformas de SOD em raízes de plântulas de crotalaria determinada em PAGE não-desnaturante.	125
Figura 20. Eletroforese em gel de proteína total na parte aérea de plântulas em função da aplicação da dose 0,05 mM de NiCl ₂ .	128

Figura 21. Eletroforese em gel de proteína total em raízes de plântulas em função da aplicação da dose 0,05 mM de NiCl₂. 129

Figura 22. Eletroforese em gel de proteína total na parte aérea de plântulas em função da aplicação da dose 0,5 mM de NiCl₂. 130

Figura 23. Eletroforese em gel de proteína total em raízes de plântulas em função da aplicação da dose 0,5 mM de NiCl₂. 131

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4 – D = ácido diclorofenoxiacético

γ -Glu-Cys = gama-glutamilcisteína

a.a. = aminoácido

AsA = ascorbato

APX = ascorbato peroxidase

BSA = soro albumina bovino

CAT = catalase

Cat1 = gene codificante da isoforma de catalase 1

Cat2 = gene codificante da isoforma de catalase 2

Cat3 = gene codificante da isoforma de catalase 3

Cd = cádmio

CdCl_2 = cloreto de cádmio

cDNA = DNA complementar

CdSO_4 = sulfato de cádmio

Cu = cobre

Chumbo = Pb

Cobalto = Co

Cu/ZnSOD = cobre/zinco superóxido dismutase

d.d = deionizada

DHA = desidroascorbato

DHAR = desidroascorbato redutase

DTNB = 5,5"- ditiobis (2- ácido nitrobenzóico)

DTT = ditioneitol

EAOs = espécies ativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

FAD = flavina adenina dinucleotídeo

FADH = flavina adenina dinucleotídeo reduzida

Fe = ferro

Fd = Ferredoxina

FeCl_3 = cloreto férrico

Fe-SOD = ferro superóxido dismutase
GR = glutationa redutase
GSH = glutationa reduzida
GSSG = glutationa oxidada
 $K_3Fe(CN_6)$ = ferricianeto de potássio
KCN = cianeto de potássio
MDA = malonaldeído
MDHAR = monodesidroascorbato redutase
Mn = manganês
MnSOD = manganês superóxido dismutase
NaCl = cloreto de sódio
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT = nitro blue tetrazolium
Ni = níquel
 $NiCl_2$ = cloreto de níquel
 NO_3 = nitrato
 O_2 = oxigênio molecular
 $O_2^{\cdot -}$ = radical superóxido
 O_2^1 = oxigênio "singlet"
.OH = radical hidroxila
PA = persulfato de amônio
PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb = chumbo
PCs = fitoquelatinas
POX = peroxidase
PSI = fotossistema I
PSII = fotossistema II
(p/v) = proporção peso/volume
PVPP = polivinil polipirrolidona
SH = grupo sulfidril
Selênio = Se
SOD = superóxido dismutase

TEMED = N, N, N', N'- tetrametilenodiamina

TLC = cromatografia de camada delgada

TRIS = tris (hidroximetil)-aminometano

Zn = zinco

RESUMO

A presença de metais pesados no ambiente é atualmente, um dos principais problemas de contaminação ambiental, uma vez que, os metais liberados no ambiente contaminam o solo e entram na cadeia alimentar através das plantas, causando efeitos tóxicos a curto e a longo prazo aos animais e seres humanos.

No caso do metal pesado Níquel (Ni), foi constatado que a sua presença nas plantas pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa de fotossíntese e provocar alterações, tanto nas atividades enzimáticas quanto metabólicas.

Pouca informação está disponível na literatura, com referência a resposta antioxidante das plantas à expressão a esse metal. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram realizar diferentes ensaios para avaliar o efeito fitotóxico do Ni em plântulas de *C. juncea*.

Neste estudo foram analisados parâmetros bioquímicos relativos à atividade das enzimas antioxidantes, Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Redutase (GR). Constatou-se que, não houve alteração da atividade GR e CAT nas raízes. Entretanto, atividades destas enzimas apresentaram aumento significativo na parte aérea. O aumento na atividade da GR, na parte aérea, pode ser explicado pelo fato de ser o ciclo Halliwell-Asada o principal mecanismo que age na desintoxicação de Espécies Ativas de Oxigênio.

Quanto à atividade da SOD, quando comparados ambos tecidos, foi constatado que na parte aérea foi pouco alterada, entretanto, a atividade da SOD foi estimulada nas raízes na presença do Ni.

Para aumentar a precisão dos resultados, quantificou-se pela técnica de Fluorescência de Raios X, a concentração de NiCl_2 e o seu efeito na absorção de nutrientes nas plântulas de crotalaria. Nesta análise, observou-se o acúmulo do metal nas raízes e baixa translocação para a parte aérea.

Também foi analisada a concentração de Malonaldeído (MDA) na parte aérea de plântulas de *C. juncea*, sendo constatada, a ocorrência de peroxidação lipídica na presença do Ni.

Finalmente, determinou-se o efeito do Ni sobre as concentrações de aminoácidos solúveis em raízes e na parte aérea, como estratégia desta planta para superar o efeito do Ni , não tendo sido observadas variações significativas nas concentrações dos mesmos com os diferentes tratamentos com Ni.

Palavra-Chave: Aminoácidos, Atividade Enzimática, Crotalária, Fitotoxicidade, Níquel, Poluição Ambiental.

SUMMARY

The contamination of the environment with heavy metals has become a world-wide problem.

Heavy metals can have direct effects on human health and decreases agricultural yields. In the presence of Nickel (Ni), plant growth and the net photosynthetic rate have been shown to be significantly reduced, even at low concentrations. Moreover, Ni can also inhibit the activity of several groups of enzymes and metabolism.

The effects of the Ni on the activities of the antioxidant enzymes and metabolism were investigated in *C.juncea* seedlings.

Enzymatic assays for Catalase (CAT) Glutathione Reductase (GR) and Superoxide Dismutase (SOD) were carried out. Response patterns for CAT and GR were similar with low values in the roots and increased activity in the shoots.

A significant increase in CAT and GR activity in the shoots suggests that these enzymes play a role in the detoxification process, of reactive oxygen species (ROS) produced by the induced Ni stress, possibly by subsequent dismutase.

On the other hand, the activity of SOD was stimulated in the roots, and decreased in the shoots.

To gain insight into the response of *C. juncea* seedlings to the oxidative damage induced by excess Ni, were conducted studies of Malondialdehyde (MDA). It was evident that Ni induced an increase in lipid peroxidation in the shoots during the studied period.

The Ni concentration in shoots and roots was determined for *C. juncea* and demonstrated an increase in the concentration of Ni in the roots, however the shoots did not present an accumulation. Further experiments were carried out on total free amino acids. It

was observed that Ni treatment did not cause any change in the accumulation of total free amino acids in the roots.

The results suggest that in *C. juncea* seedlings did not exhibit any major variation following Ni treatment.

Key words: Antioxidant enzymes, Amino acids, *C. juncea*, Nickel, Environmental Pollution.

1-INTRODUÇÃO

Atualmente, o crescimento das cidades e a expansão industrial promovem a produção de grandes quantidades de produtos químicos e metais pesados. Estes poluentes podem ser acumulados em solos cultivados e a persistência deste material no solo, pode causar problemas de toxicidade a plantas, animais e seres humanos (Poulik, 1997).

Embora as plantas absorvam somente uma pequena proporção de Ni proveniente do solo, este metal deve receber uma atenção especial, pois em plantas cultivadas em solos contaminados por este metal, foram evidenciados efeitos do Ni nas plantas como: diminuição do crescimento, alteração do sistema radicular, diminuição na divisão celular, diminuição do teor de ferro, zinco e manganês nas folhas (Simon et al., 2000).

Com relação ao efeito de metais pesados, as plantas utilizam-se, em um primeiro momento dos aminoácidos, por estes terem a capacidade de promover alguma resistência ao metal detoxificar o efeito desses em suas células. Entretanto, quando há uma sobrecarga da concentração de metais pesados, as plantas têm necessidade de ativar seus mecanismos de defesa (Briat & Lebrun, 1998). Estes mecanismos têm a função de reduzir a concentração de metais pesados livres, no citossol das células, os quais incluem: a compartimentalização deste metal em estruturas sub celulares, exclusão e/ou diminuição do transporte através da membrana e a formação de peptídeos ricos em cisteínas, conhecidos como fitoquelatinas (PCs), que podem complexar esse metal. Além das PCs, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas para tolerância à exposição aos metais pesados é a produção de um sistema redutor de defesa, que inclui componentes de baixa massa molecular tais como glutathiona e ascorbato e um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar ou limpar radicais livres e que inclui a SOD, a CAT e GR (Scandalios, 1993).

Apesar de ocasionar problemas de toxidez às plantas e animais que deles se alimentam, existe pouca informação, relativa ao efeito desse metal pesado quando introduzido no ambiente agrícola.

Desta forma, este trabalho de pesquisa teve como objetivo procurar identificar e estudar os efeitos do Ni em diferentes mecanismos de defesa de plântulas de *C. juncea*.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Efeito Tóxico do Níquel

O avanço da industrialização, durante as últimas décadas, tem provocado o aumento da exposição, no meio ambiente, de produtos químicos potencialmente tóxicos, entre eles os metais pesados, que provocam danos para animais, plantas, a saúde humana e ao próprio meio ambiente (Gratão et al., 2005).

A designação “metais pesados” vem da massa específica destes elementos ser maior que 5 g cm^{-3} , sendo também, conhecidos como “elementos traço”, por serem naturalmente encontrados em concentrações de poucas partes por milhão (Mattiazzo-Prezotto, 1994). Segundo esta autora, o Ni por possuir peso específico $8,9\text{ g/cm}^3$, 25° C , é considerado um metal pesado. Este elemento químico é encontrado no grupo VIII da tabela periódica, juntamente com o Ferro (Fe) e Cobalto (Co).

Quantidades naturais de Ni no ambiente são, geralmente, baixas porém, algumas atividades podem aumentar de forma considerável estes níveis. Tais atividades incluem o uso do Ni na produção de baterias de telefones celulares, catalisador na indústria de hidrogenação de óleos vegetais, na fabricação de moedas, no aço, na produção de armas e em ligas metálicas resistentes à corrosão (Malan & Farrant, 1998).

O Ni é considerado um elemento benéfico à planta devido à sua participação na estrutura e funcionamento da enzima urease, são observados 6 a 8 átomos de Ni por molécula, cuja função é evitar o acúmulo de uréia nas folhas, como foi constatado em salsa (Atta-Aly, 1999). A uréia é um produto do metabolismo do nitrogênio nas plantas, sendo que

o Ni favorece a atividade da urease que cataliza a hidrólise da uréia a CO_2 e NH_3 (Gerendas et al., 1999a).

Entretanto, a presença do Ni em concentrações relativamente elevadas no lodo de esgoto e em compostos descartados pela indústria pode levar ao acúmulo deste elemento no solo, ou provocar a contaminação de recursos hídricos. Conseqüentemente, este poluente pode ser submetido a solos cultivados e à sua persistência no solo, pode levar à absorção deste metal pelas plantas devido a sua transferência através cadeia alimentar e desta forma provocar danos à saúde dos animais, especialmente aos homens (Poulik, 1997). Este autor ressalta que a introdução do Ni nas plantas gera efeitos tóxicos como: a danificação do sistema radicular e diminuição da atividade respiratória. Estudos citológicos demonstraram que o Ni induziu alterações na estrutura de mitocôndria de rabanetes (Simon et al., 2000). A presença do Ni pode ter um efeito negativo em etapas importantes do metabolismo em plantas, por inibir a exportação de produtos da fotossíntese das folhas, sendo observado que nessas folhas, acumulariam quantidades crescentes de sacarose, amido e açúcares redutores, ocasionando a redução do crescimento e perdas na produção (Rao & Sresty, 2000). Baccouch et al. (1998), verificaram que esse mecanismo tem início com a presença do Ni na planta induzindo a deficiência de potássio. Estes autores ainda comentam que ausência deste elemento promove a necrose do floema, o que inibe a distribuição de carboidratos na planta. Como foi verificado em soja, em que os efeitos da toxidez do Ni expressaram-se pela inibição da maturidade das sementes e redução da biomassa desta planta (Malan & Farrant, 1998), também foi constatado que a aplicação excessiva de Ni provoca distúrbios mitóticos nas pontas das raízes de milho (Huiller et al., 1996).

A presença de Ni em cereais como aveia pode afetar principalmente a viabilidade das sementes, portanto, reduzindo a taxa de germinação (Poulik, 1997). Também foi

verificado em girassol, que o Ni foi capaz de afetar o crescimento desta planta (Zornoza et al., 1999). Em milho, sintomas de toxicidade também foram observados quando o teor de Ni no solo era alto, verificou-se que o milho apresentou lesões necróticas na ponta da raiz (Baccouch et al., 2001). Estudos, ao nível molecular, determinaram que a presença do Ni também inibiu a síntese de DNA, RNA e de proteínas em rabanetes (Espen et al., 1997). Em *Alyssum murale*, foi verificado que o Ni inibiu a atividade da DNA polimerase além de produzir efeitos adversos em algumas proteínas, como na biossíntese das mesmas (Abou et al., 2003).

Foi constatado que a mobilidade de Ni dentro da planta é alta quando comparada à de outros metais (Gerendas et al., 1999b); e que o acúmulo de Ni na planta faz-se diferentemente, sendo maior nas folhas que nos ramos, nos grãos que nas folhas, e nas partes jovens que nas partes adultas (Yu, J & Woo, 1999). Em arroz, foi observada a presença de Ni nos grãos e na palha da planta (Kumar & Dubey, 1999) e em tomate, concentrações críticas de Ni provocaram necrose nas folhas, redução do massa fresca e o acúmulo deste metal nos frutos, o que pode ser considerado perigoso à saúde humana (Palacios & Mataix, 1999).

Na região da Bahia de Levias, em Cuba, foi observada concentração de Ni no solo e foram constatados impactos ambientais ocasionados pela presença deste metal nesta região (Gonzales et al., 1997). Poulik (1997), avaliando a disponibilidade de Ni para animais e constatou a redução da capacidade imunológica e problemas no sistema nervoso quando este elemento alcançou concentrações consideradas tóxicas. Do mesmo modo, Yaman (2000), ao estudar o efeito do Ni no meio ambiente, verificou que quando submetidos a exposições a este metal, humanos e animais sofreram efeitos deletérios como destruição de eritrócitos, disfunção renal e câncer. Também, foi constatado, por estes autores que o Ni pode ocasionar a indução de leucemia em ratos.

2.1.1-Importância da *C. juncea*

No gênero *Crotalaria*, existem cerca de 500 espécies de plantas herbáceas. A espécie *C. juncea* ($2n=2x=16$), apresenta as seguintes características botânicas: é uma planta alógama, de ciclo anual, planta ereta de crescimento determinado, podendo crescer até três metros de altura e possui folhas unifoliadas (Azzini et al., 1981).

Originária do subcontinente indiano, a *C. juncea* destaca-se pela rusticidade e pela alta produção de fitomassa. É cultivada em muitos países para a produção de fibras, sendo a biomassa utilizada como componente para papéis, principalmente, para cigarros. Introduzida inicialmente no Brasil com o mesmo objetivo e em seguida, destinada como planta melhoradora do solo, é uma das espécies mais utilizadas como adubo verde na agricultura (Oliveira, 1992).

Entretanto, pouco se sabe sobre a reação da planta de crotalaria ao estresse pelo Ni.

2.1.2-Aminoácidos

Os aminoácidos podem ser sintetizados por todos os organismos vivos, embora, muitas espécies não estejam aptas a sintetizar todos os aminoácidos de que necessitam para a construção de suas proteínas e desta forma, certos aminoácidos devem ser fornecidos na dieta (Solomons, 2000). Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via da pentose fosfato em plantas (Figura 1).

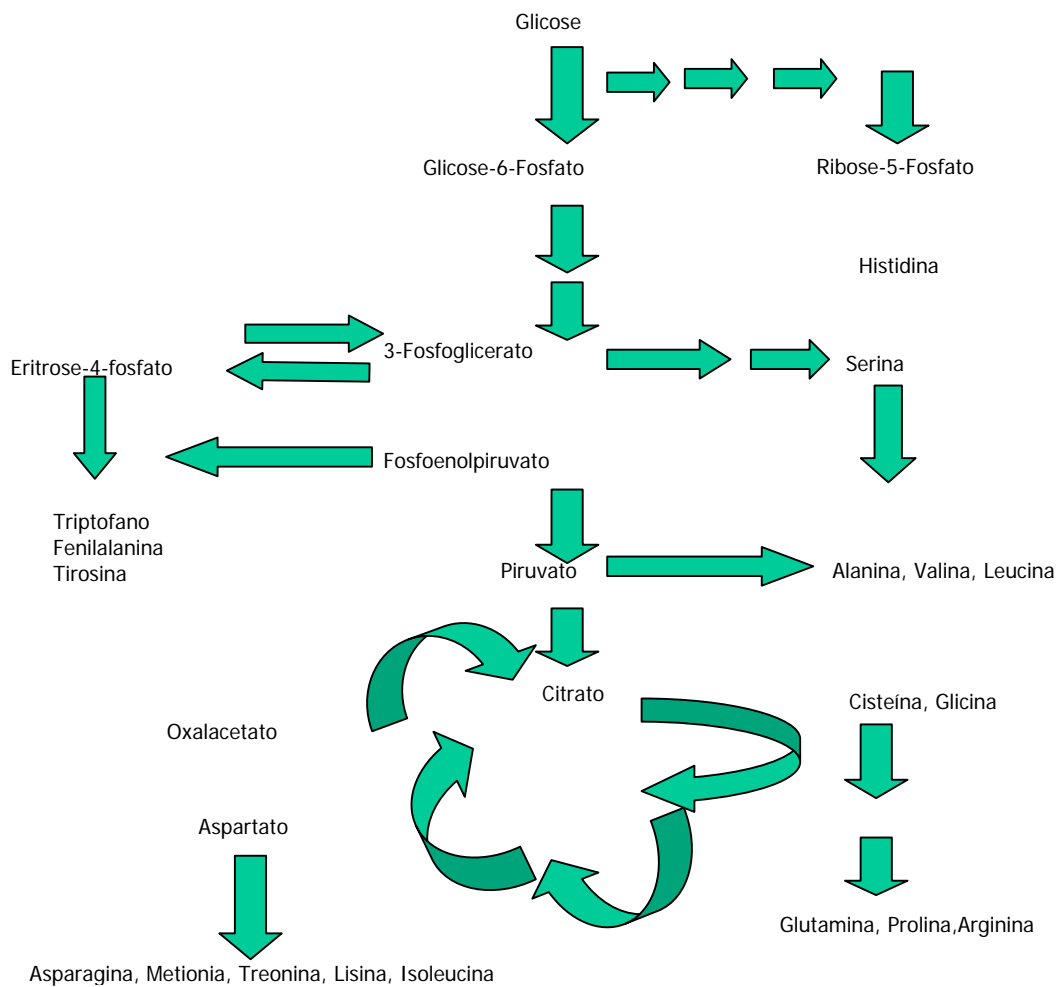


Figura 1. Via de biossíntese de aminoácidos

Dez destes aminoácidos estão próximos dos seus precursores iniciais por apenas, um ou poucos passos enzimáticos, conforme pode ser observado em bactéria (Figura 1). Para

os demais, como para os aminoácidos aromáticos, as vias biossintéticas são mais complexas (Lehninger et al., 2000). Segundo estes autores, uma maneira útil de organizar as vias biossintéticas dos aminoácidos é agrupá-las em famílias correspondentes ao precursor metabólico de cada aminoácido, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Família de aminoácidos relacionados com o precursor metabólico.

α-cetogluturato	Oxaloacetato	Fosfoenolpiruvato e Eritrose-4-fosfato
Glutamato	Aspartato	Triptofano
Glutamina	Asparagina	Fenilalanina
Prolina	Metionina	Tirosina
Arginina	Treonina	
	Isoleucina	
	Lisina	
3-fosfoglicerato	Piruvato	Ribose-5-fosfato
Serina	Valina	Histidina
Glicina	Leucina	
Cisteína	Alanina	

Alguns aminoácidos e seus derivados podem, em alguns casos, promover resistência nas plantas aos níveis tóxicos de metais pesados. Foi constatado que, estes aminoácidos no xilema podem quelatar metais pesados como o Cádmio (Cd) e o Ni (Briat & Lebrun, 1999). Em soja, foi observado o aumento de aminoácidos solúveis na seiva do xilema nestas plantas após a exposição ao Ni e ao Cd (Shintinawy & El-Ansary, 2000). Em plântulas de trigo, foi verificado que, após o tratamento com cobre (Cu) houve um acúmulo de aminoácidos solúveis como valina, lisina e arginina tanto nas raízes como na parte aérea (Lesko et al., 2001). Em *Crotalaria cobalt* exposta ao Co foi constatado um significativo aumento de cisteína, o que sugere que este aminoácido esteja envolvido na complexação do Co nas células desta planta (Oven et al., 2002). Em arroz, foi verificada a variação de prolina, um indicador de estresse hídrico, na parte aérea após a exposição desta planta ao Cu (Chen et al., 2000). Em *Alysum lesbiacum*, foram verificadas a variação de histidina na presença do metal Ni e a formação de um complexo de quelação deste metal com este aminoácido

(Kramer et al., 1996). Estes autores sugerem o envolvimento destes aminoácidos, tanto no mecanismo de tolerância, como de transporte do metal pesado pela seiva, do xilema para parte aérea da planta.

As plantas utilizam-se deste tipo de mecanismo com a finalidade de aliviar a capacidade de detoxificar o efeito do metal pesado na célula. Entretanto, quando há uma sobrecarga da concentração de metais pesados, há necessidade de ativar mecanismos de defesa oxidante nas plantas (Briat & Lebrun, 1999).

Assim, as plantas e animais desenvolveram alguns mecanismos para reduzir a concentração de metais pesados livres no citossol das células os quais incluem: o transporte e a compartimentalização deste metal em estruturas sub celulares (Lozano-Rodriguez et al., 1997) e agentes redutores de defesa, de componentes de baixa massa molecular tais como Glutathione e Ascorbato e um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar ou limpar radicais livres e que inclui a SOD, a CAT e a GR (Scandalios, 1993).

2.1.3-Sistemas detoxificadores de espécies ativas de oxigênio

O acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu, na evolução, que plantas e os organismos aeróbios utilizassem este O_2 como acceptor final de elétrons durante o metabolismo celular. Nesta redução de O_2 , pode ocorrer a transferência de energia de 4 elétrons a este elemento originando estados excitados reativos parcialmente reduzidos que são radicais livres e derivados conhecidos como Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) que incluem o Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Peróxido Hidrogênio (H_2O_2), Radical Hidroxila ($\cdot OH$) e Oxigênio "singlet" (O_2^1) (Scandalios, 1993). Foi constatado que EAOs formadas em excesso podem afetar a síntese de proteínas, induzir mutações no DNA,

redução nas taxas de fotossíntese, podendo também, destruir a integridade da membrana celular (Alscher et al., 2002).

Situações de estresse, como a exposição a altas temperaturas, altas concentrações salinas e temperaturas extremas, são potencialmente prejudiciais às plantas e um aspecto comum provocado por estes fatores adversos é que os mesmos podem levar a um desequilíbrio na capacidade da célula de formar o O_2 . Este excesso pode assim, causar o aumento da formação de EAOs, dentro dos diferentes compartimentos das células das plantas (Van Breusegem et al., 2001), como foi constatado em *Rosa hybrida* em que foi verificado que o UV-A induziu o aumento na concentração de EAOs (Helsper et al., 2003).

Os metais pesados, também são considerados indutores na formação de EAOs, como foi constatado em plantas de milho expostas ao alumínio, que induziu a formação de EAOs (Boscolo et al., 2003). Em *Cajanus cajan* após sofrer a exposição ao Ni, foi verificada a formação de EAOs, que foram responsáveis pela inativação de diferentes enzimas (Rao & Sresty, 2000).

Assim, as plantas desenvolveram mecanismos que incluem um complexo sistema de defesa antioxidante formado por compostos não enzimáticos e enzimáticos de proteção contra as EAOs (Mallick & Monh, 2000). Ainda estes autores observaram que alguns aminoácidos, como a histidina, pode-se ligar a EAOs como $O_2^{\bullet-}$, evitando desta forma danos à planta. Dentro da célula, o sistema antioxidante de defesa, inclui enzimas como SOD, CAT e Peroxidase (POX), que são responsáveis pela proteção e preservação da integridade da célula (Van Breusegem et al., 2001). As EAOs, como os $O_2^{\bullet-}$, produzidos pela reação do O_2 molecular do Fotossistema I (PSI), são rapidamente convertidos a H_2O_2 pela SOD que está associada ao tilacóide, através de reação Melher (Allen., 1996). Moléculas de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que escapam da destruição no tilacóide são destruídas pela Ascorbato Peroxidase (APX) no

cloroplasto associada à membrana do tilacóide em um ciclo conhecido como Halliwell-Asada (Fadzillah et al., 1996).

Na Figura 2, pode-se verificar a atividade destas enzimas, no processo de detoxificação da célula.

Neste ciclo, os radicais monodesidroascorbato produzidos pela APX, são convertidos a ascorbato (AsA) via ferredoxina (Fd) ou pela enzima Monodesidroascorbato Redutase (MDHA) (Foyer et al., 2003).

A APX também pode formar neste ciclo, o ácido ascórbico ou o ácido desidroascorbato, que pode ser convertido a ascorbato através da enzima Desidroascorbato Redutase (DHAR). A DHAR por sua vez, utiliza a Glutationa Reduzida (GSH) como doador de elétrons (Allen, 1995). Segundo estes autores, a subsequente regeneração da GSH requer a participação de GR e NADPH.

Entretanto, é importante ressaltar que ainda neste sistema de detoxificação de EAOs, o H_2O_2 formado na glicolato peroxidase é degradado pela CAT, principalmente, nos peroxissomos (Azevedo et al., 1998).

Tarhanen et al. (1999) constataram que o Ni ao ser absorvido pela planta, liga-se passivamente à membrana celular, pela troca de posições de íons presentes na mesma. Estes autores sugerem que o Ni pode alterar o padrão das interações entre lipídios e proteínas, e desta forma, o Ni diminui o funcionamento e organização da membrana, contribuindo para a formação de EAOs. Estas EAOs formadas possivelmente reagem com ácidos graxos insaturados das membranas e alteraram a peroxidação lipídica, induzindo a formação de malonaldeído (MDA) que é considerado um parâmetro deste processo (Vranova et al., 2002).

Realmente, foi verificado em milho, na presença do Ni, há ocorrência de peroxidação lipídica com um aumento proporcional ao nível de MDA (Bhattacharjee, 1998).

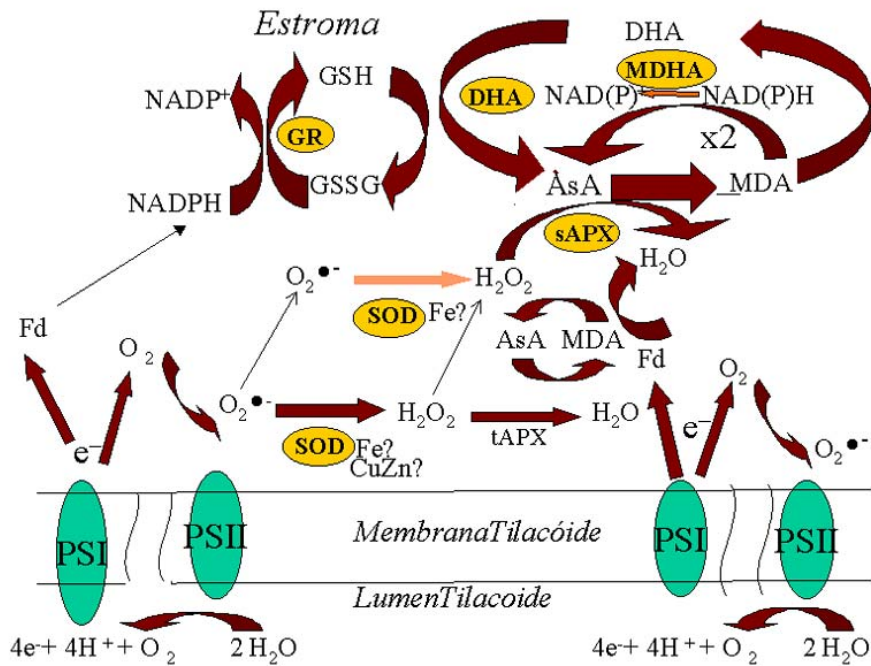
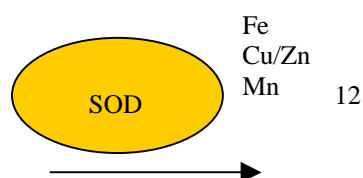


Figura 2. Esquema da via de compartilhamento de EAOs.

2.1.4-Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) pertence a um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 (Figura 2).

O $O_2^{\bullet-}$ é formado em diferentes locais da célula, onde o O_2 e a cadeia transportadora de elétrons estejam presentes, como mitocôndrias, glioxissomos e cloroplastos (Vranova et al., 2002). Estes autores, avaliando o efeito das $O_2^{\bullet-}$ nas células verificaram que estas EAOs podem competir com o sítio ativo de diferentes enzimas. Assim, não é surpresa encontrar as SOD em diferentes localizações subcelulares como um mecanismo de defesa (Alscher et al., 2002).



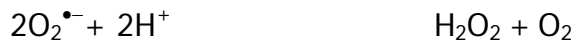


Figura 3. SOD catalisa a reação acima, eliminando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e formando H_2O_2

Existem três isoformas destas enzimas, que são classificadas a partir do íon metálico presente em seu sítio ativo: Cobre-Zinco (Cu/Zn-SOD), Manganês (MnSOD) e Ferro (FeSOD) (Sherme & Dizengremel, 1998). A FeSOD, é encontrada no cloroplasto e é uma enzima dimérica formada por 2 subunidades idênticas, MnSOD é encontrada na matriz mitocondrial, é uma enzima que possui estrutura tetramérica (Pan & Yau, 1991). Estudos realizados à filogenia da SOD indicaram que a MnSOD e a FeSOD são mais antigas e que estas isoenzimas apresentam similaridade em suas propriedades físico-químicas (Bowler et al., 1994). A Cu/Zn-SOD, é a mais abundante entre todas as metaloenzimas e são observadas no citosol e no estroma dos cloroplastos ou ligadas à membrana dos tilacóides de células. Entretanto, a Cu/Zn-SOD não apresenta similaridade com as outras isoformas de SOD. Assim, possivelmente, esta isoenzima surgiu independentemente (Alscher et al., 2002).

O número e tipo destas isoenzimas variam de planta para planta (Scandalios, 1993).

Em plantas expostas a condições ambientais adversas foi evidenciada uma alta expressão da SOD como forma de proteção há um possível estresse (Gupta et al., 1993). De acordo com Menezes-Benavente et al. (2004), diferentes pesquisas têm sido realizadas envolvendo esta enzima na tolerância a estes diferentes estresses. Como em condições de seca, em que foi observado o aumento da atividade da Cu/Zn-SOD e FeSOD em *Lupinus angustifolius* (Yu & Rengel, 1999) ou a alta salinidade que induziu o aumento da atividade da Cu/Zn-SOD em *Morus alba* (Sudhakar et al., 2001). O estresse pelo frio, provocou em pepino, a redução da concentração de proteínas e redução da atividade das diferentes isoenzimas da

SOD (Feng et al., 2003). Em arroz, o efeito do metal pesado Cd, levou ao aumento da atividade da MnSOD (Shah et al., 2001). Em milho, foi verificado que o efeito da toxidez do Ni foi capaz de inibir a atividade da SOD, durante a primeira hora de estresse (Baccouch et al., 1998), o contrário foi verificado em *Betula pentula*, onde foi observado o aumento da capacidade da atividade da SOD tanto nas raízes, como em folhas na presença deste metal (Koricheva et al., 1997), em *Cajanus cajan* foi constatado o aumento da atividade da SOD quando esta planta sofreu a exposição a este metal, indicando, desta forma, que a SOD é um importante intermediário no processo de destoxificação do Ni (Rao & Sresty, 2000).

2.1.5-Catalase (CAT)

As CATs (1.11.1.6), são enzimas hemoproteínas tetraméricas encontradas em todos organismos aeróbios, localizam-se no citoplasma e nas organelas mitocôndrias, peroxissomos sendo responsáveis pela transformação de $2\text{H}_2\text{O}_2$ em O_2 e $2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 4) (Vranova et al., 2002).

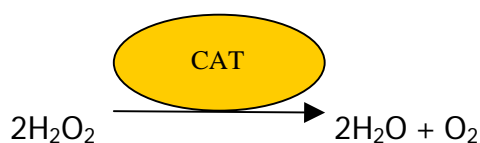


Figura 4. CAT catalisa a transformação de H_2O_2 em H_2O e O_2

A rápida eliminação do H_2O_2 , é necessária uma vez que esta EAO, pode inativar diversas enzimas pela oxidação do seu grupo tiol, como por exemplo às enzimas do Ciclo de Calvin (Edwards et al., 1994).

As plantas, assim como os animais, possuem diferentes isoformas de catalases que são codificadas por três genes: *Cat1*, *Cat2* e *Cat3* (Scandalios, 1993). Tais genes são

responsáveis pela codificação das isoenzimas Cat 1, Cat2 e Cat3 que são expressos diferentemente, dependendo do tecido e de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta (Baek & Skinner, 2003).

As Cat1 são responsáveis pela transformação do H_2O_2 produzida na fotorrespiração em H_2O e O_2 e estão localizadas no interior de peroxissomos (Menezes-Benavente et al., 2004), as Cat2 estão envolvidas no processo de lignificação e são encontradas nos tecidos vasculares (Scandalios, 1993), e as Cat3 são as mais abundantes em sementes e em plantas jovens e têm a função de catalisar a degradação de moléculas de H_2O_2 formadas durante a β -oxidação de ácidos graxos e em peroxissomos de folhas verdes durante a fotorrespiração pela transformação do glicolato em glioxilato e estão localizadas no mesófilo das células (Van Breusengem et al., 2001).

É sugerido que as isoformas de CAT podem ser reguladas, no tempo e no espaço, em resposta a diferenças de luz (Scandalios, 1993). Este fato foi verificado por Lall et al. (1998) que ao submeterem *Impatiens flanaganii* a alta intensidade de luz detectaram o aumento da atividade da CAT. Essa enzima torna-se essencial para destruição de H_2O_2 formado na fotorrespiração realizada em plantas C3. Em plantas C4 onde a fotorrespiração é reduzida foi verificada uma diminuição da atividade desta enzima (Foyer et al., 2003).

Foi constatado que o frio foi capaz de induzir a inibição da atividade da CAT em *Euphorbia esula* (Davis & Swanson, 2001). Em sementes de cevada tratadas com Cd foi verificado o aumento da expressão da atividade da CAT (Patra & Panda, 1998). Resultado semelhante foi constatado quando o efeito de Ni foi testado em plantas de *Leucaena leucocephala* coletada em solos contaminados pela adição de resíduos industriais e por este metal, que apresentou aumento da atividade da CAT (Rout & Samantary 1999). Em *Vignata radiata* o efeito da toxidez do Ni foi constatado no aumento da atividade da enzima CAT em

folhas (Samantary et al, 1999). Em milho também foi verificado aumento da atividade da CAT após 24 horas de tratamento com esse metal em raízes (Baccouch et al., 2001). Entretanto, em plantas de *Alyssum bertoni* tratadas com Ni, foi constatada a redução da atividade da CAT no decorrer do tempo de tratamento com este metal (Boominathan & Doran, 2002). Em *Cajanus cajan*, a presença do Ni também resultou na redução da atividade desta enzima em raízes (Rao & Sresty, 2000). Estes autores sugerem a possível inibição da atividade desta enzima por este metal.

2.1.6-Glutationa Redutase (GR)

Em plantas, a GSH é o componente tiol mais abundante, inclui-se como uma das principais defesas para células de plantas e animais contra uma variedade de estresses, incluindo poluição do ar, calor, frio e seca (Lea et al., 1998).

A GSH regula a síntese de fitoquelatinas e tem importante papel como antioxidante nos sistemas biológicos (Gallego et al., 1996). Singhal et al. (1987), ressaltam a GSH como tendo um importante papel de defesa da célula contra a exposição da planta a elementos tóxicos a planta. Além de promover a remoção do H₂O₂ no cloroplasto, a GSH pode controlar a quantidade de metais pesados livres no citossol (El-Shintinawy, 1999). Entretanto, para a maioria destas funções, principalmente o papel antioxidante, a GSH deve estar na sua forma reduzida. Essa oxi-redução é catalisada pela GR (Creissen et al., 1994). Segundo este autor, esta enzima, contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons, que catalisa a redução da Glutationa Oxidada (GSSG) para GSH na forma reduzida na presença da NADPH.

Desta forma, a GR (EC 1.6.4.2) tem papel fundamental na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos mantendo a razão entre os níveis de GSH e GSSG no ciclo Halliwell-Asada (Figura 5) (Mallick & Monh, 2000).

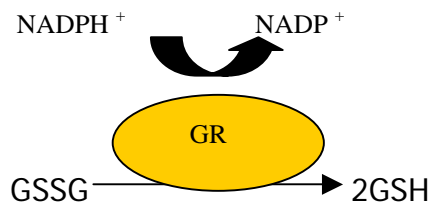


Figura 5. Esquema da GR no ciclo Halliwell-Asada

Em espinafre, em um experimento em que a planta foi exposta com ozônio, foi verificado o aumento da atividade da GR (Edwards et al., 1994). Os autores sugerem que esta enzima esteja contribuindo para reduzir a ação de EAOs nesta planta. No feijoeiro, os efeitos do tratamento realizado com baixas temperaturas expressaram-se no aumento da atividade da GR (Kocsy et al., 2000).

A atividade da enzima GR também foi pesquisada em *Pinus sylvestris* onde foi constatado que a radiação por UV-B induziu a redução da atividade desta enzima (Laakso et al., 2001).

É observado que em plantas submetidas ao estresse, por diferentes agentes da poluição, como a chuva ácida, há alteração da atividade da GR (Koricheva et al., 1997). Em tabaco, metais como Ni e chumbo (Pb) reduziram a atividade da GR, contribuindo dessa maneira para o estresse oxidativo (Stohs et al., 1997). Em *Crotalaria juncea*, foi verificado que o Cd foi capaz de induzir o aumento da atividade da GR na parte aérea desta planta (Pereira et al., 2002). A atividade de GR em raízes de trigo tem contribuído para aumentar a

tolerância ao Ni, sendo o efeito positivo através da ação da GSH, mediante a síntese de Fitoquelatina a qual conduziu a uma redução do nível de Ni livre nas raízes desta planta (Pandolfi et al., 1996).

Em folhas de *Betula pendula*, foi constatado um significativo aumento da atividade da GR após a aplicação de Ni nesta planta (Koricheva et al., 1997).

Também em plântulas de milho, foi verificado o aumento da atividade desta enzima na tolerância ao metal pesado Ni (Baccouch et al., 2001). O papel da GR na tolerância ao metal pesado Ni foi pesquisado por Rao & Sresty (2000). Ao pesquisarem o efeito do Ni em plantas de *Cajanus cajan* observaram o aumento da atividade desta enzima, na parte aérea desta planta, após o início do tratamento com Ni. Estes autores consideram que a GR esteja sendo utilizada na manutenção dos níveis da GSH, que por sua vez está sendo utilizada no ciclo Halliwell-Asada no processo de detoxificação de EAOs formadas a partir da presença deste metal neste órgão da planta.

Dificuldades na purificação e seqüenciamento em plantas superiores têm impedido algumas comparações diretas entre a seqüência de aminoácidos de uma GR de planta e de outros organismos (Creissen et al., 1994). Apesar destas dificuldades, o efeito de metais pesados sobre a atividade desta enzima em plantas, tem atraído a atenção de muitos pesquisadores.

2.1.7-Fitoquelatinas (PCs)

As plantas respondem à presença de metais pesados pela síntese de uma família de peptídeos ricos em cisteína, conhecidos como PCs, que têm a estrutura geral (γ -Glu-Cys) $_n$ Gly, onde $n=2$ a 9 (Mallick & Monh, 2000). Estes peptídeos são sintetizados em plantas a partir da fitoquelatina sintase (γ glutamilcisteína dipeptidiltranspeptidase), que transfere a γ -glutamilcisteína de uma molécula de Glutathione Reduzida (GSH) para o polímero de γ -glutamilcisteinilglicina (Howden et al., 1995).

Cabe a PCs diminuir a toxicidade dos metais pesados através da sua complexação intracelular e posterior transferência para os vacúolos (Xiang & Oliver, 1998). Sugerindo-se que a síntese de PCs, em plantas, pode ser rapidamente regulada em resposta à exposição ao metal pesado (Chen & Liu, 1996). Resultados semelhantes foram obtidos por Grill et al. (1985), que detectaram que várias espécies de plantas na presença de metais pesados, como Cd, são capazes de sintetizar PCs. Entretanto, Leopold et al. (1999), ressaltam que apenas alguns metais pesados podem formar complexos com PCs.

Com o aumento da concentração de Cd em tabaco, percebe-se o aumento na produção de PCs nas raízes desta planta (Vogeli-Lange & Wagner, 1990). Em trigo, foi constatada a indução de PCs nas raízes desta planta após a exposição ao cobre (Keltjens & van Beusichem, 1998). Plântulas de *Pinus sylvestris*, ao serem tratadas com Ni apresentaram a indução de PCs, sendo também observada a diminuição da concentração de glutathione nas raízes destas plantas (Kukkola et al., 2000). Em algumas árvores da região de Sudbury, Canadá, cultivados em solos contaminados pela adição de Ni, também foi constatado que estas plantas apresentaram toxicidade por este elemento, entretanto foi observada formação de PCs em suas raízes como uma forma de promover a detoxificação deste metal pesado (Gawel et al., 2001).

Porém, não foram relatados, até o momento, trabalhos que identificaram a formação de complexos Ni-PCs.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Cultivo do material biológico

A espécie de crotalaria utilizada nesta pesquisa foi a *C. juncea*. As sementes foram obtidas no Campo de Produção de Sementes, localizado no Município de Tupi Paulista, SP, a partir cruzamento das variedades IAC₁ e IAC₂.

Todas as plântulas utilizadas nos experimentos, foram cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"–USP, (latitude S 22° 42' 30" longitude W 47° 38' 01". Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, da "Superior de Agricultura Luiz de Queiroz"–USP).

As sementes de *C. juncea* foram germinadas em papel de germinação umedecido em água destilada e parcialmente imersas em água destilada em estufa sob condições controladas de temperatura 27° C e fotoperíodo de 14/10 h por 7 dias. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos que foram organizados sobre um substrato de vermiculita na casa de vegetação (Temperaturas 20° C a 27° C). Cada vaso recebeu em torno de 15 plantas distribuídas em placas de isopor (1,5 cm de espessura) com diâmetro compatível à parte superior do vaso. Estas plantas foram crescidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1951), em sistema de hidroponia (1,7 L por vaso) e com as raízes mantidas sempre aeradas através de um compressor odontológico (SCHULZ/1HP). As plantas crotalaria receberam concentrações Ni de específicas, de acordo com o tipo de experimento a ser realizado.

3.1.1-Experimento 1: alterações bioquímicas

Para estudar, o efeito do NiCl_2 como objetivo do experimento 1, foram as alterações enzimáticas causadas pelo efeito deste metal em plântulas de crotalária. Neste ensaio as concentrações utilizadas foram 0 mM, 0,05 mM e 0,5 mM de NiCl_2 .

O período de exposição ao Ni foi de 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 horas, sendo as plantas coletadas e divididas em raiz e parte aérea e lavadas em água deionizada durante aproximadamente 1 min, visando remover os íons, sendo então secas com papel toalha. As amostras foram congeladas em nitrogênio e armazenadas em freezer a -80°C . Para posterior determinação das atividades das enzimas antioxidantes tanto em raízes e parte aérea destas plântulas.

3.1.2-Experimento 2: Análise de aminoácidos solúveis

A realização do experimento de análise de aminoácidos solúveis, as plântulas de *C. juncea* foi realizado o mesmo procedimento experimental descrito no item 3.1. Neste ensaio, o período de exposição ao Ni foi o mesmo realizado no experimento 3.1.1, entretanto para estas plântulas as concentrações utilizadas foram 0 mM e 0,5 mM de NiCl_2 .

3.1.3-Experimento 3: Análise da concentração de NiCl_2 nos tecidos vegetais

Para a quantificação da concentração de Ni nos tecidos vegetais de *C. juncea*, uma parte do material coletado no experimento 3.1.2, foi separada para o experimento 3. Estes materiais foram secos durante 72 h a 80°C , moídos e 0,5 g de cada amostra foi colocado em recipiente apropriado para análise por fluorescência de raios X, prensada a 2

ton/cm² e levada diretamente para análise, sem passar por nenhum tipo de pré-tratamento químico.

3.2-Cromatografia em camada delgada

Para o procedimento de extração e quantificação de aminoácidos foi utilizada a técnica desenvolvida por Bielecky & Tuener (1986), com algumas modificações.

Foram usados 0,5 g de extrato vegetal tanto de raízes e parte aérea, que foram macerados em 2 mL de solução MCW (12 mL de metanol, 5 mL de clorofórmio e 3 mL de água Milli-Q). A mistura foi centrifugada por 25 000 rpm por 20 min a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi misturado à 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água Milli-Q. Da fase hidrossolúvel coletada foi retirada uma alíquota para diluição com volume final de 1 mL (completado com água Milli-Q).

Para esta análise foram utilizadas placas de sílica gel sobre poliéster de 20cm x 20 cm (Merck) e aplicadas alíquotas de 2 µL de extrato vegetal de parte aérea e raízes, nas concentrações 0 mM e 0,5 mM de NiCl₂ nas placas cromatográficas. Antes da aplicação das amostras, as placas foram ativadas a 80° C por 60 min em estufa.

Os cromatogramas foram realizados em cubas de vidro contendo solventes constituídos de uma mistura de álcool butílico, acetona, hidróxido de amônia e água deionizada nas proporções de 50:50:25:10 mL (V/V), respectivamente. Após a separação dos aminoácidos, por aproximadamente 40 min de corrida, as placas foram secas em estufa ventilada por 48 h, a temperatura ambiente e posteriormente revelados com uma solução de 0,2 % ninidrina em acetona (p/v). Padrões de histidina e prolina foram incluídos para a identificação das bandas de aminoácidos.

3.3-Determinação das atividades das enzimas anti-oxidantes

A extração enzimática foi feita partir de folhas e raízes e as enzimas verificadas foram CAT, SOD e GR. As análises destas enzimas foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes (poliacrilamida 7 %) e por espectrofotometria.

As extrações das enzimas CAT, SOD e GR foram feitas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), (4 g:1 mL) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4 % (p/v) de PVPP de acordo com a técnica desenvolvida por Azevedo et al. (1998). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 min à 4° C, utilizando-se uma centrífuga Beckman modelo J2-MC. O sobrenadante, foi coletado, dividido em alíquotas e congelados a -80° C, sendo utilizados para os ensaios das atividades enzimáticas.

3.3.1-Atividade de CAT

A atividade da CAT foi determinada em espectrofotômetro como descrito por Azevedo et al. (1998). O ensaio foi realizado A 25° C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 25 µL de H₂O₂ (solução de 30 %) preparada imediatamente antes do uso.

A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade foi determinada seguindo-se a decomposição de H₂O₂ por 1min de dosagem contínua em intervalos de 1 s por alterações na absorbância a 240 nm. Os valores de atividade foram expressos em µmol/min/mg/prot.

3.3.2-Atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada pelo método espectrofotométrico, como descrito por Beyer & Fridovich (1987). Como indicador da abordagem foi empregada a taxa de redução do nitroblue tetrazolium (NBT). Na preparação enzimática foi utilizada 50 μL de extrato vegetal, 850 μL de solução de NBT e 100 μL de riboflavina.

Após a mistura, foi determinada a variação de absorbância por min a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em Unidades mg^{-1} por proteína.

Uma unidade da atividade da SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a redução de 50 % de NBT.

A atividade da SOD em PAGE não-desnaturante, de plântulas tratadas e não tratadas com Ni, foi determinada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), com uma corrente constante de 20 mA/placa por 4 h.

Foram aplicados aos géis amostras de padrão de SOD de fígado bovino (2 unidades), 40 μg de proteína do extrato de raízes e parte aérea.

Após um tempo médio de 4 h para eletroforese, os géis foram enxaguados rapidamente em água destilada e incubados no escuro à temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de NBT e 0,3 % (v/v) de TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água destilada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. A reação foi interrompida incubando-se o gel em uma solução 7 % (v/v) de ácido acético por 15 min.

3.3.3-Characterização das isoenzimas da SOD.

Para determinação das isoformas de SOD, as raízes e a parte aérea foram submetidas a PAGE não desnaturante em minigel (8 %). A eletroforese foi conduzida a 4° C com uma corrente constante de 15 mA/placa por 4 h. A amostra foi aplicada no gel em concentração de 40 µg de proteína de extrato de raízes e parte aérea.

Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes iguais. A primeira foi revelada para atividade de SOD como acima (3.3.2), a segunda e a terceira parte foram incubadas por 20 min em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 2 mM de KCN e 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 5 mM de H₂O₂, respectivamente. Após este período, ambas as partes foram lavadas e reveladas para atividade de SOD. O pré-tratamento dos géis em H₂O₂ e KCN antes da revelação de SOD permitiu a classificação das isoenzimas da SOD em Cu/Zn-SOD, FeSOD ou Mn-SOD. Mn-SOD é resistente à ambos inidores, a FeSOD é resistente ao KCN e inibida por H₂O₂ e Cu/Zn-SOD é inibida por ambos inibidores (Azevedo et al., 1998).

3.3.4-Atividade da GR

A atividade de GR foi determinada como descrito por Azevedo et al. (1998). A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente a 30° C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB, 1 mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH.

A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato vegetal. A taxa de GSSG foi monitorada pelo aumento, A cada segundo, na absorbância a 412 ηm por 1 min. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{prot}$.

3.4-Determinação de proteínas

A concentração de proteína foi determinada por espectrofometria à 595 ηm como descrito pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o kit Bio-Rad e soro albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5-Eletroforese de proteínas totais

O estudo de proteínas em foi realizada em gel de poliacrilamida-desnaturante (SDS-PAGE).

A eletroforese foi conduzida a 4° C e a corrente constante utilizada foi de 20 mA/placa, por cerca de quatro horas.

Para cada gel foram aplicadas amostras padrão 2 μg de proteína e 5 μg de proteína dos extratos vegetais dos tratamentos de 0,05 mM e 0,5 mM de NiCl_2 .

A revelação para atividade de proteínas foi realizada com sistema com prata de acordo com Gomes (1995). Os géis foram incubados em solução fixadora (40 % de Etanol P.A., 10 % de ácido acético, preparada em água deionizada), durante a noite. Logo após, procedeu-se a uma nova incubação em uma solução contendo 17 g de acetato de sódio $3\text{H}_2\text{O}$, 75 mL de etanol 96°GL P.A., 1 g de tiosulfato de sódio, 1,3 mL de glutaraldeído a 25 % (adicionado somente na hora do uso), para um volume final de 250 mL. Após essa incubação, lavou-se o gel 3X por 15 min com água deioneizada. Após esse passo, adicionou-

se ao gel a solução de prata (15 min) contendo 0,25 g de nitrato de prata e 50 µL de formaldeído (adicionado na hora do uso). Para revelação, foi utilizada uma solução contendo 6,25 g de carbonato de sódio e 25 µL de formaldeído (adicionado na hora do uso). Para finalizar a revelação foi feita uma solução paralizadora com 3,65 g de EDTA, para um volume final de 250 mL.

3.6-Determinação dos aminoácidos solúveis por espectrofotômetro

Após a extração, tanto para o extrato radicular quanto na parte aérea como descrito em 3.2, utilizou-se o método proposto por Azevedo et al. (2003) para a quantificação dos aminoácidos solúveis. Procedeu-se a reação de 250 µL de extrato vegetal com 500 µL do tampão citrato 0,2 M (pH 5,0), 200 µL de solução ninidrina 5 % em metil Glicol + 1 mL de solução KCN 0,0002 M. O ensaio foi aquecido a 100° C por 20 min e, após, resfriado por 10 min em água corrente. Acrescentou-se posteriormente neste ensaio 1 mL de álcool etílico 60 %, seguindo-se a leitura espectrofotômetro em $\lambda=570 \text{ nm}$.

A concentração de aminoácidos solúveis totais foi avaliada utilizando-se curva padrão de solução Leucina.

3.7-Determinação da concentração de Ni, Fe e Zn nos tecidos vegetais de plantas tratadas

A quantificação da concentração dos elementos químicos Ni, Fe e Zn foram realizadas em amostras expostas à concentração 0,5 mM e foi realizada através da técnica analítica denominada fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), em equipamento disponível no Laboratório de Instrumentação

Nuclear, da Divisão de Desenvolvimento de Métodos e Técnicas Analíticas e Nucleares, do CENA/USP e utilizou-se o método proposto por Nascimento (1999).

As amostras foram secas durante 48 h a 35° C, moídas e em seguida 0,5 g de cada amostra foi colocado em recipiente apropriado para análise por fluorescência de raios X, prensada a 2 ton/cm² e levada diretamente para análise, sem passar por nenhum tipo de pré-tratamento químico.

A excitação foi feita com raios X Mo-K α de 17,44 keV, provenientes de um tubo de raios X com alvo de Mo e filtro de Zircônio, operado a 25kV e 10mA, possibilitando a detecção do elemento químico Ni pelos seus raios-X característico K α . As amostras foram excitadas por 300 s, sendo os raios-X detectados por um espectrômetro multicanal, baseado em detector semicondutor de Si (Li) e eletrônica nuclear convencional.

A concentração do elemento Ni foi estimada através da intensidade dos raios X característica, levando-se em conta o efeito matriz. A validação da metodologia foi realizada analisando-se uma amostra de referência certificada (*hay powder*, V-10) produzida pela Agência Internacional de Energia Atômica, Viena.

3.8-Peroxidação de lipídeos

A peroxidação lipídica na parte aérea de *C. juncea* foi determinada pela estimativa do conteúdo de malonaldeído a partir do método de Heath & Packer (1968) com algumas modificações. Amostras 0,3 g do material foram maceradas em 1,3 mL (0,1 %) de ácido tricloracético (TCA) na presença de 20 % de PVPP. Após completa homogeneização, 1,4 mL foi transferido para tubos do tipo eppendorf para que fossem centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Do sobrenadante foi retirado 0,5 mL e adicionados 2 mL de TCA (20 %) contendo

0,5 % de ácido tiobarbiturico. Após deixar em banho maria a 95° C por 30 min foi feito um rápido resfriamento em gelo. Após a mudança de cor, transferiu-se 1,4 mL da amostra foram transferidas para tubos tipo eppendorf para serem centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também com o objetivo de clarificar um pouco a coloração.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a $\lambda=535$ e 600 nm. A determinação da concentração da MDA foi determinada através da formula:

$$C = \text{ABS} (535-600) / E.B.$$

Onde E= Coeficiente de extinção=155 mM⁻¹/cm, B=Comprimento óptico. Desta fórmula, obteve-se C=ABS (535-600) x 155 mM.

A quantidade do MDA foi expressa em mmol/ mg tecido fresco.

4-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Os dados foram estatisticamente analisados para os experimentos e os resultados expressos pela regressão polinomial. Para os demais ensaios realizados, em que não houve ajuste em regressão polinomial os dados foram analisados e expressos pela média e desvio padrão (\pm SD).

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Considerações gerais

Os organismos vivos estão sujeitos aos mais diversos fatores ambientais que podem induzir a formação de EAOs. Estas EAOs por sua vez, podem promover estresse oxidativo imediato.

Ao longo da evolução, os organismos, entre eles as plantas, desenvolveram vários mecanismos de defesa para proteção de suas células contra danos oxidativos provocados por estas EAOs. Várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de uma melhor compreensão destes processos.

Estudos realizadas em plantas consideraram que os metais pesados promovem várias alterações fisiológicas, induzindo reações oxidativas e desencadeando a geração de EAOs.

Entretanto, as informações referentes ao comportamento dos metais pesados adicionados as plantas, realizados e verificados na literatura, envolvem em sua maioria, parâmetros morfológicos com algumas das espécies de crotalaria.

Pouco tem sido discutido sobre o efeito do Ni em relação aos mecanismos de fitotoxicidade, a sua influência na formação de EAOs e outros processos desencadeados em crotalárias.

Neste estudo, realizado com *C. juncea* após a exposição ao Ni, constatou-se o desenvolvimento das raízes e da parte aérea com o aumento de exposição ao metal no período de tempo estudado. Estes dados não foram mostrados, uma vez que se torna imprescindível que se usem recursos diferenciados dos adotados nas avaliações rotineiras

sobre o efeito de metais pesados em plantas e se tratando da espécie utilizada neste estudo, não existem muitos trabalhos considerando aspectos bioquímicos.

Os resultados obtidos permitiram constatar que o teor de Ni aumentou nas raízes em função das doses crescentes e pode-se observar que a presença do Ni na parte aérea induziu a peroxidação lipídica, conforme o estudo de MDA permitiu constatar nesta parte da planta. Verificou-se ainda com relação à toxicidade deste metal, que as doses de Ni utilizadas influenciaram na distribuição de Fe e Zn tanto em raízes como na parte aérea.

Com os estudos bioquímicos realizados pode-se verificar que o Ni afetou a atividade das enzimas envolvidas no sistema antioxidante de defesa.

Aparentemente, as doses de Ni utilizadas neste estudo, alteraram a produção de proteínas em *C. juncea*. Estas proteínas, possivelmente, passam a participar nos processos metabólicos como fonte de energia para a planta.

5.2. ARTIGO 1

Título: Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment

Número de páginas: 30

Total de Figuras: 2

Autor para correspondência: Ricardo A. Azevedo, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; FAX: 0055 19 3433 6706; e-mail: raazeved@esaql.usp.br

Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment

Priscila Lupino Gratão¹, Majeti Narasimha Vara Prasad², Patrícia Felipe Cardoso³, Peter John Lea⁴ and Ricardo Antunes Azevedo^{1,*}

¹Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; ²Department of Plant Sciences, School of Life Sciences, University of Hyderabad Hyderabad 500 046, India; ³Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ⁴Department of Biological Sciences, University of Lancaster, Lancaster LA1 4YQ, United Kingdom. *Corresponding author: raazeved@esalq.usp.br

The contamination of the environment by toxic metals poses a threat for “Man and biosphere”, reducing agricultural productivity and damaging the health of the ecosystem. In developed nations, this problem is being addressed and solved to some extent by using green technology” involving metal tolerant plants, to clean up the polluted soils. The use of naturally occurring metal tolerant plants and the application of genetic manipulation, should hasten the process of transferring this technology from laboratory to field. Therefore, it is essential to investigate and understand how plants are able to tolerate toxic metals and to identify which metabolic pathways and genes are involved in such a process. Recent advances in knowledge derived from the “omics”, have considerable potential in developing this green technology. However, strategies to produce genetically altered plants to remove, destroy or sequester toxic metals from the environment and the long-term implications, must be investigated carefully.

Key words: hyperaccumulator plants, phytoremediation, toxic metals.

Fitorremediação: tecnologia verde na limpeza de metais tóxicos do ambiente: A contaminação do ambiente por metais tóxicos torna-se uma ameaça tanto para o homem quanto para a biosfera, impedindo o desenvolvimento da agricultura e prejudicando os ecossistemas. Em nações desenvolvidas, esse problema está sendo direcionado e resolvido, consideravelmente, com o uso de plantas tolerantes especializadas na limpeza de substratos contaminados e poluídos com metais. O uso de plantas que naturalmente acumulam metais e a aplicação da engenharia genética (metalômicas) acelerariam o processo de transferência de toda essa tecnologia do laboratório ao campo. É essencial, portanto, investigar e entender como essas plantas funcionam e quais os caminhos metabólicos e genes envolvidos no processo. A combinação das tecnologias das “ômicas” tem um prodigioso potencial no desenvolvimento dessa tecnologia verde. Entretanto, estratégias para produzir plantas geneticamente alteradas para remoção, destruição ou seqüestro de substâncias tóxicas do ambiente e suas implicações devem ser cuidadosamente investigadas.

Palavras-chave: plantas hiperacumuladoras, fitorremediação, metais tóxicos.

INTRODUCTION

The contamination of the environment with toxic metals has become a worldwide problem, affecting crop yields, soil biomass and fertility, contributing to bioaccumulation in the food chain. In the last few decades, research groups have recognised that certain chemical pollutants such as toxic metals, may remain in the environment for a long

period and can eventually accumulate to levels that could harm humans. Moreover, the numerous classes and types of these chemicals, complicate the removal of many toxic metals from the environment. As an alternative, an ecological technological approach has been developed involving the use of plants to clean up or remediate soils contaminated with toxic metals. Certain plants, termed hyperaccumulators, have

been shown to be resistant to heavy metals and are capable of accumulating and transporting these soil pollutants to high concentrations. Thus, biological and engineering strategies designed to improve the use of phytoremediation to reduce the amount of heavy metals in contaminated soils, has begun to emerge.

Toxic metals: The focus of researchers on the phytoremediation of toxic metals in the environment has been considered an area of major scientific and technological progress and is a subject of contemporary relevance (Table 1). The widespread accumulation of heavy metals in soils is becoming a serious problem, as a consequence of industrial activity worldwide. Mining wastes, fertilisers, paper mills and toxic elements from atmospheric emissions, have all contributed to the continuous deposition and resulting accumulation of toxic metals in the environment. The concentrations of toxic metals in polluted soils are often hundreds of times greater than that required to exert a toxic effect on the majority of higher plants. Toxic metals can affect the biosphere for long periods of time and can be leached through the soil layers leading to the contamination of the water table. Consequently, the use of plants contaminated with high levels of heavy metals for food, might pose a serious risk to human and animal health (Wang et al., 2003).

Table 1. Social and economic dimensions of toxic trace elements, metalloids and radionuclides and areas of scientific investigation (Prasad 2004a).

Area	Scope for detailed investigation
Ecotoxicology and ecophysiology	Nutrient availability efficiency and Deficiency for optimization of crop yield
Environmental chemistry waste management and mine reclamation	Bioremediation and restoration of metal contaminated and polluted ecosystems
Agricultural and nutritional sciences food industry	Plant and soil serve as vital links for supplementing nutrients on sustainable basis
Clinical biochemistry	Usage of radiolabelled antibodies and their disposal
Medicine and pharmacology	Use of plants as a source of certain disorders nutrients for
The atomic energy sector	The nuclear weapon testing (release of mainly ^{14}C , ^{137}Cs , ^{90}Sr and ^{95}Zr) production (release of mainly ^{137}Cs , ^{106}Ru , ^{95}Zr) and nuclear power production

Phytoremediation: present outcomes: Phytoremediation is the process that introduces plants into an environment and allows them to assimilate the contaminants into their roots and leaves. Such a process has been used to clean up heavy metals, pesticides and xenobiotics (Suresh and Ravishankar, 2004), organic compounds (Newman and Reynolds, 2004), toxic aromatic pollutants (Singh and Jain, 2003) and acid mine drainage (Archer and Caldwell, 2004). Interestingly, phytoremediation was recognized and documented by humans more than 300 years ago, however the scientific study and development of suitable plants was not conducted until the early 1980's (Lasat, 2000).

Phytoremediation is considered to be an environmentally friendly technology, that is a safe and also a cheap way to remove contaminants, in some cases doing the same job as a group of engineers for one tenth of the cost. However, such technology cannot necessarily be effective all of the time or be used in all types of contaminated sites. If the contamination runs too deep, or the concentration of toxic compounds is too high, then plants alone cannot efficiently remediate the soil (Cunningham et al., 1995).

Phytoremediation of toxic metals: Soils may become polluted with high concentration of toxic metals and their remediation may often involve excavation and removal of soil to secured landfills, an expensive technology that requires site restoration (Glick, 2003). Moreover, besides being an expensive and labour intensive effort, cleaning up contaminated sites has been accompanied by secondary environmental and legal problems. The phytoremediation of heavy metal contaminated soil basically involves the extraction or inactivation of these metals in soils (Lombi et al., 2001). However, some metals such as Pb are largely immobile in soil and their extraction rate is limited by solubility and diffusion to the root surface (Lombi et al., 2001). Conventional technologies suitable for water and soil remediation used *in situ* and *ex situ* are: pneumatic fracturing, soil flushing, solidification/stabilization, vitrification, chemical reduction/oxidation, soil washing and excavation. All these methods are cost prohibitive and often can generate secondary waste (Prasad, 2003). The use of several chelating agents, such as EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA (ethylene glycol-O,O'-bis-[2-amino-ethyl]-N,N,N',N'-tetraacetic acid), EDDHA (ethylenediamine di(o-hydroxyphenylacetic acid) and citric acid, has been developed to chemically enhance phytoextraction by mobilizing metals and increasing metal accumulation (Cooper et al., 1999). However, there is a potential risk of leaching of metals to

the ground water and there is still a lack of detailed studies regarding the persistence of metal-chelating agent complexes in contaminated soils (Lombi et al., 2001).

It is also known that some metal contaminated soils are difficult to remediate and such soils are usually excavated and land filled. Sites can also be treated by acid leaching, physical separation of the contaminant or electrochemical processes (Cunningham et al., 1995). Moreover, the costs associated with soil remediation are variable and depend on the properties of the soil, the contaminants, site conditions and the volume of material to be remediated (Cunningham et al., 1995). Considering these limitations, phytoremediation is one innovative approach that offers more environmental benefits and a cost effective alternative.

In phytoextraction and phytomining, accumulated toxic metals in plant tissues are harvested for metal recovery and reuse. Normally, the plants termed hyperaccumulators are preferably used, since they have the ability to withstand and build up high concentrations of metals, when compared to other plants. These plants can be processed to recover the metals accumulated during the phytoremediation process (figure 1). Although it is cheaper than the conventional methods, phytoremediation is not an easy technology that consists of simply planting and growing some hyperaccumulating plants in the metal polluted area (Alkorta et al., 2004). It is in fact a highly technical strategy, requiring expert project designers with field experience that choose the proper species and cultivars for particular metals and regions (Alkorta et al., 2004). Research carried out with hyperaccumulator plant species has mainly focused attention on the physiological mechanisms by which the metal is taken up, transported and sequestered, but little is known regarding the genetic basis of hyperaccumulation when compared with the genetic basis of metal tolerance (Pollard et al., 2002). There is evidence for a quantitative genetic variation controlling the ability of these plants to hyperaccumulate between and within populations (Pollard et al., 2002).

Transgenic plants vs natural hyperaccumulators: The ideal plant to make practical use of the phytoremediation technique must necessarily have a considerable capacity of metal uptake, accumulation and durability to reduce the length of treatment. Metal hyperaccumulator plants have been found in a wide range of families of vascular plants (Reeves and Baker, 2000; Prasad and Freitas 2003), but the Brassicaceae are well represented. However, most of the known metal hyperaccumulating plant species are metal selective, their growth rate is usually slow, they produce relatively small amounts of biomass and most of them can

be used in their natural habitats only (Kamnev and van der Lelie, 2000). Moreover, the application of hyperaccumulator plants can be further limited because little is known about their agronomic characteristics, pest management, breeding potential and physiology, growing often in remote regions and in certain cases, their habitat is threatened by mining, development and others activities (Cunningham et al., 1995). Therefore there appears to be a promising alternative in the development of transgenic plants with improved properties of metal uptake, accumulation and tolerance of toxicity. Such metal accumulation and tolerance could be enhanced by overexpressing natural or modified genes encoding antioxidant enzymes or those that are involved in the biosynthesis of glutathione and phytochelatins (figure 2).

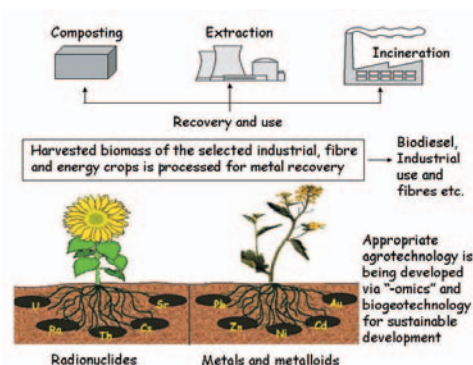


Figure 1. The approach of “green technology” for the clean up toxic metals, metalloids and radionuclides in the environment.

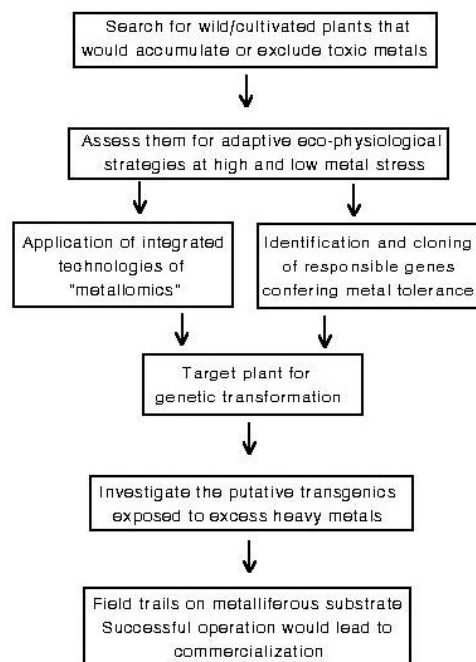


Figure 2. The use of genetic engineering to breed plants with superior phytoremediation potential (Modified after Karenlampi et al., 2000; Prasad, 2004b).

From the preceding discussion it is apparent that in order to breed plants with superior phytoremediation potential, it is necessary that these plants have a high rate of biomass production and are sufficiently strong and competitive in the climate they are to be used for phytoremediation (Pilon-Smits and Pilon, 2002). Moreover, plants suitable for phytoremediation should possess the ability to accumulate the target metal in the above-ground parts, and to tolerate the metal concentration that is to be accumulated (Karenlampi et al., 2000). The overexpression of a gene encoding a rate limiting gene product would be expected to lead to a faster overall rate of the pathway and to more efficient phytoremediation (Pilon-Smits and Pilon, 2002). However, it must be considered that metals rarely occur alone in the environment and an adaptive tolerance may be essential for several metals simultaneously (Karenlampi et al., 2000).

Transgenic plants: Several researchers have already reported encouraging results using plants bioengineered with increased heavy metal tolerance and uptake of heavy metals for the purpose of phytoremediation.

An increasing number of attempts have been made to construct transgenic plants that are tolerant to the presence of high concentrations of toxic metals and thus may be suitable for phytoremediation (Berken et al., 2002; Rugh, 2004; Tong et al., 2004; Eapen and D'Souza, 2005). The majority of these novel plants have only been tested under limited laboratory conditions and very few have been grown in the field. In this section we will cover the general areas of plant metabolism that have already been investigated and discuss just a small number of the successes that have been obtained.

S-metabolism, glutathione and phytochelatin: Selenium (Se) is essential as a micronutrient for humans and animals but is toxic at medium to high concentrations. Se occurs naturally in soils as selenate and selenite and often as a pollutant, following the industrial use of coal. Se and sulphur (S) have very similar chemical properties and their uptake and assimilation as selenate and sulphate, to incorporation in proteins as selenomethionine and methionine, proceed through common pathways and are catalyzed by the same enzymes. A research group lead by Norman Terry and Elizabeth Pilon-Smits has considered the possibility of overexpressing a range of genes encoding key enzymes in sulphur metabolism, with the aim of obtaining selenium tolerant plants.

Indian mustard (*Brassica juncea*) plants overexpressing ATP sulphurylase were shown to have higher shoot Se

concentrations and enhanced Se tolerance compared to wild type when grown in the presence of selenate in either hydroponic systems or soil (Pilon-Smits et al., 1999; Van Huysen et al., 2004). Interestingly, young transgenic plants that were overexpressing ATP sulphurylase, were more tolerant than the wild type to As(III), As(V), Cd, Cu, Hg, and Zn, but less tolerant to Mo and V (Wangelin et al., 2004). Other transgenic Indian mustard plants overexpressing cystathionine- γ -synthase (CGS) showed a higher Se volatilization rate, lower shoot Se levels, and higher Se tolerance than wild type grown in either soil or hydroponically (Van Huysen et al., 2003;2004).

Astragalus bisulcatus is a native plant that has the capacity to grow on Se containing soils and accumulate Se to high concentrations but it has a slow growth rate. It has been proposed that in *A. bisulcatus* selenocysteine methyltransferase (SMT) specifically methylates selenocysteine (SeCys) to produce the nonprotein amino acid methylselenocysteine MetSeCys, which causes a reduction in the intracellular concentrations of SeCys and selenomethionine (SeMet), thus preventing their incorrect insertion into protein. Indian mustard plants overexpressing the *A. bisulcatus* SMT gene, exhibited a greatly increased accumulation of MetSeCys and tolerance to Se compounds, in particular selenite (LeDuc et al., 2004).

Cd is a toxic element that normally occurs in low concentrations in soils, however the concentration can be significantly increased by activities such as zinc mining, iron foundries and the use of sewage sludge as a fertilizer in agriculture (Zhao et al., 2003). Cd may be detoxified in plants by a family of sulphur rich peptides termed phytochelatin (PCs) that are able to bind Cd and some other heavy metals (Cobbett and Goldsbrough, 2002). The peptides are structurally related to glutathione and contain a varying number (normally 2-5) of glutamate and cysteine, linked through the γ -carboxyl group of glutamate. Phytochelatin synthase (PCS) has been characterized as a specific γ -glutamyl cysteine dipeptidyl transpeptidase (EC 2.3.2.15) (Vatamaniuk et al., 2004), which carries out the conversion of glutathione to PCs, and has been shown to be activated by Cd.

Various attempts have been made to increase the formation of PCs, by overexpressing genes encoding enzymes that could stimulate the synthesis of cysteine and glutathione. Cysteine synthase catalyses the last step in the assimilation of sulphate into the amino acid. Transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase in the

cytosol, had elevated concentrations of PCs, were more tolerant to Cd, but did not accumulate the metal in the leaves (Harada et al., 2001). In contrast, Dominguez-Solis et al. (2004) overexpressed cysteine synthase in the cytosol of *A. thaliana*. One transgenic line was shown to be particularly resistant to Cd and to accumulate high concentrations in the leaves mainly in the trichomes. Transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase in either the cytosol or chloroplasts were more tolerant to metals such as Cd, Se and Ni. F₁ plants with expression in both the cytosol and chloroplast exhibited a higher tolerance than the other transgenic lines and accumulated Cd in the shoots (Kawashima et al., 2004).

Indian mustard overexpressing the *E. coli gshI* gene encoding γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) exhibited increased tolerance to Cd and had higher concentrations of PCs and γ -GluCys, compared to the wild-type. When tested in a hydroponic system, γ -ECS plants grew better and accumulated Cd in the shoots (Zhu et al., 1999b). Transgenic Indian mustard containing the *E. coli gshII* gene encoding glutathione synthetase (GS) accumulated significantly more Cd than the wild type in the shoot and the plants showed enhanced tolerance to Cd at both the seedling and mature-plant stages (Zhu et al., 1999a). Zhu et al. (1999b) concluded from the results obtained with the two types of transgenic plants, that under normal conditions that γ -ECS limits the rate of glutathione and PC synthesis, but that in the presence of Cd γ -ECS is activated and that GS becomes rate limiting. When grown in contaminated soil, the thiol-overproducing transgenic γ -ECS and GS Indian mustard plants showed enhanced phytoextraction capacity, yet still produced the same shoot biomass as the wild type. As a result, the total shoot metal accumulation of the γ -ECS and GS transgenics were 1.5-fold higher for Cd, and 1.5- to 2-fold higher for Zn. Furthermore, the γ -ECS transgenics accumulated 2.4 to 3-fold more Cr, Cu, and Pb, relative to the wild type (Bennett et al., 2003).

Following the positive results obtained with overexpressing the enzymes involved in cysteine and glutathione synthesis, it was expected that overexpressing PCS would be even more successful, however this did not prove to be the case for Cd toxicity. When PCS was overexpressed in *A. thaliana*, the transgenic plants were shown to be hypersensitive to Cd and Zn but not to Cu (Lee et al., 2003b). In a similar series of experiments, overexpressing PCS in *A. thaliana*, Li et al. (2004) demonstrated that the transgenic plants were highly resistant to arsenic (As),

accumulating 20–100 times more biomass on 250 and 300 μ M arsenate, than the wild type. However again the PCS plants were hypersensitive to Cd, despite the fact that they contained 2-6 fold higher concentrations of PCs. However, transgenic tobacco *Nicotiana glauca* expressing wheat PCS showed a slight increase in tolerance to Cd (Gisbert et al., 2003). These somewhat surprising results were discussed in detail by Li et al. (2004) and they concluded that “much is still to be learned about the processing of cadmium in Cd-PC peptide complexes”.

Metallothioneins: Metallothioneins (MTs) are low molecular mass cysteine rich proteins that were originally isolated as Cu, Cd and Zn binding proteins in mammals. There is now good evidence that four categories of these proteins occur in plants, which are encoded by at least seven genes in *A. thaliana* (Cobbett and Goldsbrough, 2002). A wide range of MT genes from various sources have been overexpressed in plants, these include human (Misra and Gedamu, 1989), mouse (Maiti et al., 1991; Pan et al., 1994), Chinese hamster (Hattori et al., 1994) and yeast (Hasegawa et al., 1997; Thomas et al., 2003). There was some variation in the range of Cd tolerance obtained. Metal uptake and accumulation in the shoots was not markedly altered, ranging from 70% less to 30% more than the wild type controls.

When a pea (*Pisum sativum*) MT gene *PsMTA* was expressed in *A. thaliana*, more Cu (several-fold in some plants) accumulated in the roots of transformed than of control plants (Evans et al., 1992). Similarly when a type 2 MT gene, *tyMT*, cloned from Cattail (*Typha latifolia*), a wetland plant with constitutional tolerance, was introduced into *A. thaliana*, the transgenic plant showed an increased tolerance to both Cu²⁺ and Cd²⁺ (Zhang et al., 2004). The *A. thaliana* metallothionein proteins AtMT2a and AtMT3 were introduced as fluorescent protein-fused forms into the guard cells of *Vicia faba*. The MTs protected guard cell chloroplasts from degradation upon exposure to Cd, by reducing the presence of reactive oxygen species. It was concluded that the Cd stays bound to the MT in the cytoplasm and is not sequestered into the vacuole, as occurs when Cd is detoxified by PCs (Lee et al., 2004).

Transporters: There has been considerable interest in the possibility of manipulating transporters within plants in order to achieve different objectives, these include exclusion of a toxic metal ion, transporting the metal into the apoplasmic space and transporting the metal into the vacuole where it

would be less likely to exert a toxic effect (Tong et al., 2004). In this article we will only cover a little of the extensive work that has been carried out.

Lee et al. (2003a) transformed *A. thaliana* plants with the *E. coli* gene, *ZntA*, which encodes a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II) transporter. The *ZntA*-transgenic plants grew better than the wild-type plant in Pb, Cd and Zn -containing medium. The shoots of the transgenic plants exhibited decreased Pb and Cd contents, whereas transgenic protoplasts showed lower accumulation of Cd and faster release of pre-loaded Cd than wild-type protoplasts. Lee et al. (2003a) proposed that the *ZntA*-transgenic plants excluded the metal ions at the cellular level by pumping them from the plasma membrane to the extracellular space.

The overexpression of the *AtHMA4* gene, which encodes a *A. thaliana* P-1B-ATPase Zn and Cd transporter, improved the growth of both primary and secondary roots in the presence of toxic concentrations of Zn, Cd and Co. A determination of metal content demonstrated that the overexpressing lines, when exposed to toxic concentrations of Zn or Cd, translocated these metals at a greater extent to the shoot, compared to the control plants, an important criteria for phytoremediation. In contrast, the metal level was found to be rather similar in roots, indicating that the metal uptake by the roots compensated for the increased metal translocation to the shoot (Verret et al., 2004).

The vacuole is generally considered to be the main storage site for metals in yeast and plant cells and there is evidence that phytochelatin-metal complexes are pumped into the vacuole. The best characterized of the known vacuolar transporters and channels involved in metal tolerance is YCF1 from *Saccharomyces cerevisiae*. YCF1 is a MgATP-energized glutathione S-conjugate transporter responsible for vacuolar sequestration of compounds after their S-conjugation with glutathione. Song et al. (2003) overexpressed the *YCF1* gene in *A. thaliana* and the YCF1 proteins were found to be associated with the tonoplast and the plasma membrane. The vacuoles of the YCF1-transgenic plants exhibited a fourfold higher rate of glutathione-Cd uptake than those of wild-type plants, indicating that expression of *YCF1* strongly increases Cd transport activity. The transgenic plants showed improved resistance to both Cd and Pb and elevated metal content, characteristics desirable for phytoremediation.

Other transporter proteins that could be of value include: - the *A. thaliana* antiporter CAX2 (Hirschi et al., 2000), LCT1, a nonspecific transporter for Ca²⁺, Cd²⁺, Na⁺ and K⁺ (Antosiewicz and Hennig, 2004), the *Thlaspi caerulescens*

heavy metal ATPase, TcHMA4 (Papoyan and Kochian, 2004), a novel family of cysteine rich membrane proteins that mediate Cd resistance in *A. thaliana* (Song et al., 2004) and AtMRP3, an ABC transporter (Bovet et al., 2005).

It can be seen from the above account of work that has been already carried out, that there are a large number of possibilities to improve the ability of plants to withstand the stresses of high concentrations of toxic metals and also to accumulate them. Additional work not mentioned includes overexpressing genes encoding: - ACC deaminase (Grichko et al., 2000), mercuric ion reductase (Che et al., 2003), arsenate reductase (Dhankher et al., 2003), aldose/aldehyde reductase (Hegedüs et al., 2004) and enzymes of histidine biosynthesis (Wycisk et al., 2004).

Clearly there may be some opportunity to combine some of these genes in fast growing species, but more importantly the plants need to be tested under carefully regulated environmental conditions.

Natural hyperaccumulators: Natural metal hyperaccumulator plants can accumulate and tolerate greater metal concentrations in shoots than those usually found in non-accumulators, without visible symptoms. According to Baker and Brooks (1989), the minimum threshold tissue concentrations for Co, Cu, Cr, Pb or Ni hyperaccumulators should be 0.1% dry weight, while for Zn or Mn the threshold is 1%. Over 400 hyperaccumulator plants have been reported and include members of the Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunoniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae, and Euphobiaceae. The Brassicaceae is a very important group when heavy metal accumulation is concerned, with several species being able to hyperaccumulate more than one metal (Prasad and Freitas, 2003).

Pistia stratiotes was examined in the presence of several distinct heavy metals separately, in order to determine the ability of the plant to tolerate and accumulate the metals tested and for eventual use for phytoremediation of waste water or natural water bodies polluted with these heavy metals (Odjegba and Fasidi, 2004). *P. stratiotes* exhibited different patterns of response to Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn, and although concentrations as high as 5 mM resulted in distinct levels of growth inhibition and biomass production, all the elements accumulated at high concentrations mainly in the root system. Furthermore, this plant species exhibited the highest tolerance index to Zn and the lowest to Hg (Odjegba and Fasidi, 2004).

Spartina plants have been shown to be 3-fold more tolerant to Hg than tobacco plants, due to an ability to absorb organic Hg and transform it into an inorganic form (Hg^+ , Hg^{2+}). The inorganic Hg then accumulates in the underground parts of the plants and is transferred back to the soil by diffusion and permeation, indicating that this species may be used in the phytoremediation of a Hg polluted environment (Tian et al., 2004). According to Bennicelli et al. (2004), the water hyperaccumulator fern *Azolla caroliniana* Willd. (Azollaceae) has the capacity to purify waters polluted by Hg and Cr by accumulation of these heavy metals in its tissues.

Helianthus annuus has been shown to concentrate Pb in the leaf and stem indicating that it has the prerequisites of a hyperaccumulator plant that could be used in the restoration of abandoned mines and factories sites contaminated with elevated Pb levels in the soil (Boonyapookana et al., 2005). In an almost similar manner, *Hemidesmus indicus* has also been shown to be a Pb hyperaccumulating plant species, but the heavy metal was mainly accumulated in roots and shoots (Chandra et al., 2005), exhibiting a high potential for use in the phytoremediation of industrial areas contaminated with this metal. The hyperaccumulator *Sesbania drummondii* is a plant species that has been shown to predominantly accumulate Pb as lead acetate in roots and leaves, although lead sulfate and sulfide have also been detected in leaves, whereas lead sulfide was detected in root samples (Sharma et al., 2004). These results have indicated that *S. drummondii* is able to biotransform lead nitrate in the nutrient solution to lead acetate and sulfate in its tissues and the complexation with acetate and sulfate may be a lead detoxification strategy in this plant species (Sharma et al., 2004).

Studies related to As accumulation in *Lemna gibba* have demonstrated that this plant species can be a preliminary bioindicator for As transfer from substrate to plants, indicating its use to monitor the transfer of arsenic from lower to higher trophic levels in abandoned mine sites (Mkandawire and Dudel, 2005). Moreover, *L. gibba* can be used for As phytoremediation of mine tailing waters because of its high accumulation capacity (Mkandawire and Dudel, 2005). *Pteris vittata* can hyperaccumulate As from naturally contaminated soils, but may be suitable for phytoremediation only in the moderately contaminated soils (Caille et al., 2004). In addition to *P. vittata*, *P. cretica*, *P. longifolia* and *P. umbrosa* are also able to hyperaccumulate As to a similar extent (Zhao et al., 2002).

Broadhurst et al. (2004) have development commercially viable phytoremediation/phytomining technologies

employing *Alyssum* Ni-hyperaccumulator species, where the majority of Ni is stored either in the leaf epidermal cell vacuoles, or in the basal portions of the numerous stellate trichomes. The metal concentration in the trichome basal compartment was the highest ever reported for healthy vascular plant tissue, approximately 15-20% dry weight (Broadhurst et al., 2004).

Solanum nigrum and *Conyza canadensis* have not only been shown to accumulate high concentration of Cd, but also to be tolerant to the combined action of Cd, Pb, Cu and Zn (Wei et al., 2004). The hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. has a high Cd-accumulating capability, acquiring Cd from the same soil pools as non-accumulating species, by very efficient mechanisms (Schwartz et al., 2003). Thus, *T. caerulescens* may be used as a tool to efficiently reduce the availability of Cd in soils, providing appropriate populations are used (Schwartz et al., 2003). Moreover, *Arabis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn, with phytoextraction capacities almost equal to *Thlaspi caerulescens* (Kubota and Takenaka, 2003) and plants of the mined ecotype of *Sedum alfredii* Hance have a greater ability to tolerate, transport, and accumulate Cd, when compared to the non-mined ecotype (Xiong et al., 2004).

Al hyperaccumulators have also been described and can include mainly woody, perennial taxa from tropical regions. These hyperaccumulator plants can take up aluminum in their aboveground tissues in quantities above 1000 ppm 0.1 % dry weight, exceeding those present in the soil or in the nonaccumulating plant species growing nearby (Jansen et al., 2002). These hyperaccumulators are particularly common in basal branches of fairly advanced groups such as rosids (Myrtales, Malpighiales, Oxalidales) and asterids (Cornales, Ericales, Gentianales, Aquifoliales) and in 27 other families, Al hyperaccumulation is restricted to subfamilies, tribes, or genera (Jansen et al., 2002).

In the case of Se and Mn, *Stanleya pinnata* is a potentially useful species for phytoremediation due to its broad adaptation to semi-arid western U. S. soils and environments, and its uptake, metabolism and volatilization of Se (Parker et al., 2003), whereas an Australian native hyperaccumulator of Mn, *Austromyrtus bidwillii* (Benth.) Burrett (Myrtaceae) has been identified (Bidwell et al., 2002). *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae) is a Mn hyperaccumulator species which grows rapidly, has substantial biomass, wide distribution and a broad ecological amplitude, demonstrating its potential for use in the phytoremediation of Mn-contaminated soils (Xue et al., 2004).

Understanding the mechanisms of rhizosphere interaction, uptake, transport and sequestration of metals in hyperaccumulator plants will lead to designing novel transgenic plants with improved remediation traits (Eapen and Souza, 2005). Moreover, the selection and testing of multiple hyperaccumulator plants could enhance the rate of phytoremediation, making this process a successful one for bioremediation of environmental contamination (Suresh and Ravishankar, 2004).

Advantages and limitations of phytoremediation: Several processes can limit the performance of plants in phytoremediation, such as the availability of the toxic metal ions in the soil for uptake by plant roots, the rate of uptake of the contaminants by plant roots, their translocation from roots to shoots and the extent of tolerance, or the rate of chemical transformation into less toxic, possibly volatile compounds (Prasad, 2003) (Table 2).

Although the use of transgenic plants as phytoremediators is showing increasing potential for soils contaminated with toxic metals, possible risks should be considered, including the uncontrolled spread of the transgenic plants due to interbreeding with populations of wild relatives. Moreover, the transformation of metals into forms more bioavailable could increase the exposure of wildlife and humans to metals. However, the risk of metal accumulation in plant

shoots that can be ingested by the wildlife, can be minimized by the reduction of the growth period and thus exposure of the transgenic plants. Furthermore, it is important that in the case of harvesting crop plants normally used to feed livestock and humans, the translocation of the toxic elements to the seeds is avoided at all costs.

Full utilization of plant resources after they have been used for phytoremediation is an unsolved problem. Therefore the testing of the plants used in phytoremediation is necessary and may support their continuous use in contaminated soils. For instance, *Elsholtzia argyi* flowers are used as fragrances and antiseptics due to the perfume ingredient and antibacterial components existing in their essential oils, and the analysis of these plants in Pb/Zn mined area, where they normally occur revealed that they can be safely exploited (Peng and Yang, 2005).

While phytoremediation processes hold a great promise as a way to remediate contaminated soils, there are disadvantages and limitations that must be carefully considered.

CONCLUDING REMARKS AND OUTLOOK

It is evident that phytoremediation has benefits to restore balance to a stressed environment, but it is important to proceed with caution. The study and use of genetic

Table 2. Advantages and limitations of some of the sub-processes of phytoremediation (Prasad 2004b).

Advantage	Limitation
<i>Phytoextraction</i>	
The plant must be able to produce abundant biomass in short time. E.g. in green house experiments, gold was harvested from plants (Anderson et al., 1998).	Metal hyperaccumulators are generally slow-growing and bio-productivity is rather small and shallow root systems. Phytomass after process must be disposed off properly.
<i>Phytostabilization</i>	
It circumvents the removal of soil, low cost and is less disruptive and enhances ecosystem restoration/re-vegetation.	Often require extensive fertilization or soil modification using amendments, long-term maintenance is needed to prevent leaching.
<i>Phytovolatilization</i>	
Contaminant/Pollutant will be transformed in to less-toxic forms. E.g. elemental mercury and dimethyl selenite gas. Atmospheric processes such as photochemical degradation for rapid decontamination/transformation.	The contaminant or a hazardous metabolite might accumulate in vegetation and be passed on in later products such as fruit or lumber. Low levels of metabolites have been found in plant tissue.
<i>Phytofiltration/rhizofiltration</i>	
It can be either in situ (floating rafts on ponds) or <i>ex situ</i> (an engineered tank system); terrestrial or aquatic.	pH of the medium to be monitored continually for optimizing uptake of metals; chemical speciation and interactions of all species in the influent need be understood; functions like a bioreactor and intensive maintenance is needed.

modifications must be performed in order to determine the true costs and benefits of this technology to the ecosystem as a whole, before is to be applied to a larger scale. Progress in the field of molecular genetics, will allow the analysis of metal hyperaccumulator plants and should provide new insights into metabolic detoxification processes and identify tolerance genes, thus providing considerable more information about the genomes of these model organisms.

Advances in other methods involving analysis of “omics” technologies could further reveal the non-targeted identification of all gene products in a specific biological sample, which could be followed by a refined analysis of quantitative dynamics in biological systems. The genomics can accelerate the discovery of genes that confer key traits, allowing their modification. In addition, metabolomics can provide biochemical and physiological knowledge about network organization in plants subject to toxic metal stress, providing a much more details understanding of the molecular basis of hyper-accumulation.

Approaches allowing recombination hotspots to be highlighted will further aid plant breeding efforts. Many signalling pathways and proteins can contribute to the cellular stress response, and the identification of the key ones within the stress response network is essential. The development of DNA and RNA microarray chip technologies in systematic genome mapping, sequencing, functioning and experimentation may allow the identification and genotyping of mutations and polymorphisms, allowing better insight into structure-function interaction of genome complexity under toxic metal stress. Moreover, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways are activated in response to metal stress, which encourages new strategies for improving plant tolerance to heavy metals and phytoremediation.

Molecular genetics approaches such as insertion mutagenesis involving populations of T-DNA, can be used to identify genes involved in hyper-accumulation or transposon tagged plants screened to identify mutants impaired in the ability to accumulate metals (Pollard et al., 2002). Recently, considerable progress has been made in identifying plant genes encoding metal ion transporters with important functions in cation transport and homeostasis (Papoyan and Kochian, 2004; Weber et al., 2004). Modern molecular techniques, bioinformatics and computational techniques are effective tools for detailed structure-function genome analysis. It is clear that both fundamental and applied research must be carried out in association, since the lack of the basic understanding will make it difficult to exploit many

of the recent advances in plant molecular biology.

Phytoremediation technology is still in its early development stages and full scale applications are still limited. The results already obtained have indicated that the plants are effective and could be used in toxic metal remediation. Although it appears to be common sense among scientists, engineers, and regulators about the more widespread future use of this technique, it is important that public awareness about this technology is considered and clear and precise information is made available to the general public to enhance its acceptability as a global sustainable technology to be widely used.

As this article was being completed, we were made aware of a review by Pilon-Smits (2005) that had become available and we recommend it to those with a serious interest in phytoremediation.

Acknowledgments: The authors wish to thank the continuous support over the years by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil and The British Council.

REFERENCES

- Alkorta I, Hernández-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C (2004) Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3:71-90.
- Anderson CWN, Brooks RR, Stewart RB, Simcock R (1998) Harvesting a crop of gold in plants. *Nature* 395: 553-554.
- Antosiewicz DM, Hennig J (2004) Overexpression of *LCT1* in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.* 129:237-245.
- Archer MJG, Caldwell RA (2004) Response of six Australian plant species to heavy metal contamination at an abandoned mine site. *Water Air Soil Poll.* 157:257-267.
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements— a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1:81-126.
- Bennett LE, Burkhead JL, Hale KL, Terry N, Pilon M, Pilon-Smits EAH (2003) Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings. *J. Env. Qual.* 32:432-440.
- Bennicelli R, Stepniewska Z, Banach A, Szajnocha K, Ostrowski J (2004) The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. *Chemosphere* 55:141-146.
- Berken A, Mulholland MM, LeDuc DL, Terry N (2002) Genetic engineering of plants to enhance selenium phytoremediation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:567-582.

- Bidwell SD, Woodrow IE, Batiannoff GN, Sommer-Knudsen J (2002) Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwillii* (Myrtaceae) from Queensland, Australia. *Funct. Plant Biol.* 29:899-905.
- Boonyapookana B, Parkplan P, Techapinyawat S, DeLaune RD, Jugsujinda A (2005) Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *J. Environ. Sci. Heal. A* 40:117-137.
- Bovet L, Feller U, Martinoia E (2005) Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environ Int.* 31:263-267.
- Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Maugel TK, Erbe EF, Murphy CA (2004) Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environ. Sci. Technol.* 38:5797-5802.
- Caille N, Swanwick S, Zhao FJ, McGrath SP (2004) Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilisation. *Environ. Pollut.* 132:113-120.
- Chandra Sekhar K, Kamala CT, Chary NS, Balaram V, Garcia G (2005) Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 58:507-514.
- Che DS, Meagher RB, Heaton ACP, Lima A, Rugh CL, Merkle SA (2003) Expression of mercuric ion reductase in Eastern cottonwood (*Populus deltoides*) confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotech. J.* 1:311-319.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53:159-182.
- Cooper EM, Sims JT, Cunningham SD, Huang JW, Berti WR (1999) Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 28:1709-1719.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW (1995) Phytoremediation of contaminated soils. *TIBTECH* 13:393-397.
- Dhankher OP, Shasti NA, Rosen BP, Fuhrmann M, Meagher RB (2003) Increased cadmium tolerance and accumulation by plants expressing bacterial arsenate reductase. *New Phytol.* 159:431-441.
- Dominguez-Solis JR, Lopez-Martin MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol. J.* 2:469-476.
- Eapen S, D'Souza SF (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotech. Adv.* 23:97-114.
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP, Shi J, Tommey AM, Robinson NJ (1992) Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for PsMTA function. *Plant Mol. Biol.* 20:1019-1028.
- Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Bernal MP, Serrano R, Navarro-Aviñó J (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303:440-445.
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21:383-393.
- Grichko VP, Filby B, Glick BR (2000) Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J. Biotechnol.* 81:45-53.
- Harada E, Choi YE, Tsuchisaka A, Obata H, Sano H (2001) Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J. Plant Physiol.* 158:655-661.
- Hasegawa I, Terada E, Sunairi M, Wakita H, Shinmachi F, Noguchi A, Nakajima M, Yazaki J (1997) Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant Soil* 196:277-281.
- Hattori J, Labbé H, Miki BL (1994) Construction and expression of a metallothionein- β -glucuronidase gene fusion. *Genome* 37:508-512.
- Hegedüs A, Erdei S, Janda T, Tóth E, Horváth G, Dudits D (2004) Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Sci.* 166:1329-1333.
- Hirschi ED, Korenkey, VD, Wilganewski NI, Wagner, GI (2000) Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124:128-133.
- Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68:235-269.
- Kamnev AA, van der Lelie D (2000) Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Rep.* 20:239-258.
- Karenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, van der Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI (2000) Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Pollut.* 107:225-231.
- Kawashima CG, Noji M, Nakamura M, Ogra Y, Suzuki KT, Saito K (2004) Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotechnol. Lett.* 26:153-157.
- Kubota H, Takenaka C (2003) *Arabidopsis gemmifera* is a hyperaccumulator of Cd and Zn. *Int. J. Phytoremediation* 5:197-200.
- Lasat MM (2000) Phytoextraction of metals from contaminated sites – a critical review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J. Hazard Substance Res.* 2:1-25.
- LeDuc DL, Tarun AS, Montes-Bayon M, Meija J, Malit MF, Wu CP, AbdelSamie M, Chiang CY, Tagmount A, DeSouza M, Neuhierl B, Bock A, Caruso J, Terry N (2004) Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium

- tolerance and accumulation. *Plant Physiol.* 135:377-383.
- Lee J, Bae H, Jeong J, Lee JY, Yang YY, Hwang I, Martinoia E, Lee Y (2003a) Functional expression of a bacterial heavy metal transporter in *Arabidopsis* enhances resistance to and decrease uptake of heavy metals. *Plant Physiol.* 133:589-596.
- Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y (2004) *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol. Biol.* 54:805-815.
- Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS (2003b) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131:656-663.
- Li Y, Dhankher OP, Carreira L, Lee D, Chen A, Schroeder JI, Balish RS, Meagher RB (2004) Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity. *Plant Cell Physiol.* 45:1787-1797.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, MacGrath SP (2001) Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30:1919-1926.
- Maiti IB, Hunt AG, Wagner GJ, Yeagan R, Hunt AG (1991) Light inducible and tissue specific expression of a chimeric mouse metallothionein cDNA gene in tobacco. *Plant Sci.* 76:99-107.
- Misra S, Gedamu L (1989) Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants. *Theor. Appl. Genet.* 78:161-168.
- Mkandawire M, Dudel EG (2005) Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Sci. Total Environ.* 336:81-89.
- Newman LA, Reynolds CM (2004) Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotech.* 15:225-230.
- Odjegba VJ, Fasidi IO (2004) Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology* 13:637-646.
- Pan AH, Yang M, Tie F, Li L, Che Z, Ru B (1994) Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 24:341-351.
- Papoyan A, Kochian LV (2004)** Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase¹. *Plant Physiol.* 136:3814-3823.
- Parker DR, Feist LJ, Varvel TW, Thomason DN, Zhang YQ (2003) Selenium phytoremediation potential of *Stanleya pinnata*. *Plant Soil* 249:157-165.
- Peng HY, Yang XE (2005) Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *J Zhejiang Univ. Sci.* 6:91-95.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.
- Pilon-Smits E, Pilon M (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:439-456.
- Pilon-Smits EAH, Hwang S, Lytle CM, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction and tolerance. *Plant Physiol.* 119:123-132.
- Pollard AJ, Powell KD, Harper FA, Smith JAC (2002) The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:539-566.
- Prasad MNV (2004a) Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. 2nd edn. Springer-Verlag Heidelberg Narosa New Delhi.
- Prasad MNV (2004b) Phytoremediation of metals in the environment for sustainable development. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 70:71-98.
- Prasad MNV (2003) Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russ. J. Plant Physiol.* 50:686-700.
- Prasad MNV, Freitas H (2003) Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6:275-321. Online electronic journal <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/index.html>
- Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds), *Phytoremediation of Toxic Metals*, pp. 193-229. John Wiley, NY.
- Rugh CL (2004) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals Genetically engineered phytoremediation: one man's trash is another man's transgene. *Trends Biotech.* 22:496-498.
- Sharma NC, Gardea-Torresdey JL, Parsons J, Sahi SV (2004) Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:2068-2073.
- Schwartz C, Echevarria G, Morel JL (2003) Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 24:27-35.
- Singh OV, Jain RK (2003) Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Appl. Microbiol. Biotech.* 63:128-135.
- Song W-Y, Martinoia E, Lee J, Kim D, Kim D-Y, Vogt E, Shim D, Choi KS, Hwang I, Lee Y (2004) A novel family of Cys-Rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135:1027-1039.
- Song W-Y, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotech.* 21:914-919.
- Suresh B, Ravishankar GA (2004) Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24:97-124.
- Thomas JC, Davies EC, Malick FK, Endreszl C, Williams CR, Abbas M, Petrella S, Swisher K, Perron M, Edwards R, Ostenkowski P, Urbanczyk N, Wiesend WN, Murray KS (2003) Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils. *Biotech. Prog.* 19:273-280.

- Tian JL, Zhu HT, Yang YA, He YK (2004) Organic mercury tolerance, absorption and transformation in *Spartina* plants. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 30: 577-582.
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004) Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci.* 9: 7-9.
- Van Huysen T, Abdel-Ghany S, Hale KL, LeDuc D, Terry N, Pilon-Smits EAH (2003) Overexpression of cystathionine-gamma-synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* 218:71-78.
- Van Huysen T, Terry N, Pilon-Smits EAH (2004) Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathionine-gamma-synthase. *Int. J. Phytoremed.* 6:111-118.
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lang A, Chalasani S, Demkiv LO, Rea PA (2004) Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis - Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *J. Biol. Chem.* 279:22449-22460.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, Vavasseur A, Richaud P (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett.* 576: 306-312.
- Wang QR, Cui YS, Liu XM, Dong YT, Christie P (2003) Soil contamination and uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J. Environ. Sci. Heal. A* 38:823-838.
- Wangelin AL, Burkhead JL, Hale KL, Lindblom SD, Terry N, Pilon M, Pilon-Smits EAH (2004) Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard: Effects on tolerance and accumulation of twelve metals. *J. Env. Qual.* 33:54-60.
- Weber M, Harada E, Vess C, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J.* 37:269-281.
- Wei SH, Zhou QX, Wang X, Cao W, Ren LP, Song YF (2004) Potential of weed species applied to remediation of soils contaminated with heavy metals. *J. Environ. Sci. (China)* 16:868-873.
- Wycisk K, Kim EJ, Schroeder JI, Kramer U (2004) Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 578:128-134.
- Xiong YH, Yang XE, Ye ZQ, He ZL (2004) Characteristics of cadmium uptake and accumulation by two contrasting ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *J Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 39:2925-2940.
- Xue SG, Chen YX, Reeves RD, Baker AJ, Lin Q, Fernando DR (2004) Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae) *Environ. Pollut.* 131:393-399.
- Zhang YW, Tam NFY, Wong YS (2004) Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia*. *Plant Sci.* 167:869-877.
- Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2002) Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytol.* 15:27-31.
- Zhao FJ, Lombi E, McGrath SP (2003) Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249:37-43.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N (1999a) Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:73-79.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 121:1169-1178.

ARTIGO 2

Título: Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure

Número de páginas: 30

Total de Figuras: 7

Autor para correspondência: Ricardo A. Azevedo, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; FAX: 0055 19 3433 6706; e-mail: raazeved@esaql.usp.br

Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure

Patrícia Felipe Cardoso¹, Alejandro Alberto Toro², Rui Alberto Gomes-Junior², Leonardo Olivera Medici³, Priscila Lupino Gratão² and Ricardo Antunes Azevedo^{2*}.

¹ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil; ² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil; ³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. * Corresponding author: raazeved@esalq.usp.br

The response of *Crotalaria juncea* seedlings to Nickel (Ni) was investigated. Ni was shown to accumulate in the root system, but not in the shoots. Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) responses to Ni were similar. Increases in CAT and GR activities in the shoots suggests that these enzymes play a role in the detoxification process, possibly by scavenging the reactive oxygen species (ROS) produced by the induced Ni stress. It was also evident an increase in lipid peroxidation in the shoots during the period studied. Ni did not cause any changes in the accumulation of total free amino acids content.

Key words: amino acids, antioxidant enzymes, heavy metals, nickel, reactive oxygen species.

Resposta de *Crotalaria juncea* à exposição ao Níquel: A resposta de plântulas de *Crotalaria juncea* ao níquel (Ni) foram investigadas. O Ni acumulou no sistema radicular, mas não nas partes aéreas. As respostas da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e da glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2) ao Ni foram similares. O aumento da atividade dessas enzimas na parte aérea das plântulas de *C. juncea* sugere que estas enzimas tem um papel na destoxificação de espécies ativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo estresse induzido por Ni. Foi também evidente o aumento na peroxidação lipídica na parte aérea durante o tratamento. O Ni não alterou o padrão de acúmulo de aminoácidos livres.

Palavras-chave: aminoácidos, enzimas antioxidantes, espécies reativas de oxigênio, metais pesados, níquel.

INTRODUCTION

In the majority of natural environments the concentration of heavy metals in the soil is low and does not normally cause any significant phytotoxic effects (Gratão et al., 2005). The increasing contamination and subsequent accumulation of heavy metals in the soil due to human activities such as mining, fertilizers and sewage waste (Dudka and Miller, 1999), may have serious consequences for agriculture since the concentration of heavy metals may reach high levels in the soil and become a limiting factor for normal plant growth (Vögeli-Lange and Wagner, 1996).

The effect of heavy metals such as mercury (Hg), lead (Pb), cadmium (Cd) and the semi-metal arsenic (As) are recognized as health hazardous due to their severe damaging effect to the environment (Berghund et al., 1984). Moreover, the presence of some metals, like copper (Cu), zinc (Zn) and Cd in soils are becoming a serious worldwide problem as a consequence of industrial activity, since the accumulation of these metals is able to cause significant reduction in crop yields (Wang et al., 2003). For example, the substitution of Mg^{2+} in chlorophyll *in vivo* by Cu has a damaging effect leading to the inhibition of photosynthesis (Küpper et al., 2003). Selenium (Se) is chemically related to Sulfur (S) with the affinity of enzymes involved in S metabolism being similar for Se and S, thus Se at high concentrations may become toxic due to its incorporation into S-containing molecules, in particular due to the specific replacement of cysteine by Se-cysteine complex (Surai, 2002).

Nickel (Ni) has perhaps one essential role in plants, which is to form the active metalcenter of hexameric enzyme urease (EC 3.5.1.5.) (Gerendas et al., 1999). This enzyme is mainly found in plant seeds, with two Ni ions being linked to each urease subunit (Gerendas et al., 1999). Ni is not toxic at low concentrations, however, it becomes toxic at high concentrations (Poulik, 1997). Ni pollution in soils and waterways occurs mainly as a result of effluents from

mining, smelting and electroplating industries and from sewage sludge and compost (Barcan and Kovnatsky, 1998).

Ni is rapidly taken up by the plant root system and research with different plant species has shown that Ni is able to inhibit a large number of plant enzymes such as those of the Calvin cycle and chlorophyll biosynthesis (van Assche and Clijsters, 1990). Ni is also able to inhibit those enzymes related nitrogen metabolism (Boussama et al., 1999a, 1999b), and sulphate assimilation (Lee and Leustek, 1999). Recent reports on the effects of Ni in the photosynthetic assimilation of CO₂ have indicated that the enzymes of the Calvin cycle and RUBISCO are particularly sensitive to Ni (van Asscher and Clisters, 1990).

The exposure to heavy metals and other adverse environmental factors can disrupt the cellular homeostasis and enhance the production of several activated oxygen species, designated as reactive oxygen species (ROS), such as superoxide (O₂^{•-}), hydroxyl radicals (•OH), oxygen singlet (O₂¹) and hydrogen peroxide (H₂O₂), that are continuously produced in the plant metabolism (Foyer and Noctor, 2003). ROS are involved in lipid peroxidation, cause DNA breakage, inactivate enzymes and lead to chlorophyll breakdown (Somashekaraiah et al., 1992; Stroinski and Kozłowska, 1999).

Plants possess very efficient enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems that allow the scavenging of ROS and protection of plant cells from oxidative damage (Gratão et al., 2005). Due to the different cell metabolic processes that naturally produce ROS, including photosynthesis, photorespiration, fatty acid oxidation and senescence, plants have developed a series of detoxification reactions, which are located in distinct cell organelles where the activity of enzymes involved in the dismutation of ROS such as catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD), take place (Gratão et al., 2005).

H₂O₂ can be directly metabolized by peroxidases, particularly those from the cell wall and by CAT in the peroxisome (Azevedo et al., 1998; Polidoros and Scandalios, 1999). In the chloroplast, O₂^{•-} is converted by SOD into H₂O₂, which is then detoxified to H₂O and O₂ by the

glutathione-ascorbate cycle, which involves the action of several enzymes, including GR (Foyer et al., 2003).

Several studies have been carried out with plants to evaluate the effect of heavy metals on the activity of antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GR (Gratão et al., 2005). For instance, Cd has been shown to induce significant changes in enzyme activities, particularly a dramatic effect on GR activity (Vitória et al., 2001; Pereira et al., 2002), suggesting that Cd-induced ROS are metabolized probably via the glutathione-ascorbate cycle. Although more limited information is available for Ni when compared to Cd, the reports presented some contradictions. For instance, in maize Ni induced membrane lipid peroxidation and stimulated SOD activity (Baccouch et al., 2001), however, inhibition of SOD activity was observed in roots of *Betula pendula* exposed to Ni (Koricheva et al., 1997). In *Agropyron repens* plants tolerant to Ni the activity of CAT was shown to be markedly high (Brej, 1998). Ni did not significantly affect GR activity in *Betula pendula* (Koricheva et al., 1997) and maize roots exposed to this metal (Baccouch et al., 2001). However, plants of the genus *Alyssum* exhibited an elevated GR activity in response to Ni treatment (Schickler and Caspi, 1999). In general, the antioxidative enzyme responses have been shown to vary according to the species, tissue analyzed, concentration and exposure time of the metals (Hegedus et al., 2001). Moreover, a group of plants designated as hyperaccumulators can grow in soils containing heavy metals and are able to translocate these heavy metals from roots to shoots where it is accumulated (Boominathan and Doran, 2002).

The present study has been carried out to examine the effects of Ni on the activity of antioxidant enzymes in the legume plant species *C. juncea* which is used as a compost (green fertilizer).

MATERIAL AND METHODS

Plant material: Seeds of *C. juncea* kindly donated by the Production Seed Bank located in Tupi Paulista, SP; were germinated on moistened germinating paper in a growth chamber under controlled environmental conditions (60-80% relative humidity, 27-30°C temperature and a 16/8 h

photoperiod at $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance for 7 d. At the end of this period, seedlings of approximately the same size were selected and transferred to 1.7 L pots containing Hoagland's nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1953) and maintained in a hydroponic system in a glasshouse (16/8 h photoperiod at 25-32°C). After an extra 7 d growth period under these conditions, the Hoagland solution was replaced with a new solution containing different NiCl_2 concentrations (0 mmol.L^{-1} , 0.05 mmol.L^{-1} and 0.5 mmol.L^{-1}). After periods of 12, 24, 48, 72 and 96 h of growth in the presence of Ni, seedlings were collected, washed in distilled-deionized water and stored frozen at -80°C for further analysis.

The experiment's design was the randomized complete block with treatments arranged as individual pots, with ten plants per plot, each replicated 3 times. Data were analyzed with appropriate statistical analyses (test for polynomial regression for dosage effect). The data was transformed according to appropriate equations, with the objective of stabilizing the variances and to better show the differences among treatments.

Total Free Amino Acid: The total free amino acid content of shoots and roots was determined as described by Azevedo et al. (2003).

Metal Analysis: Quantitative analytical methodology was carried out for root and shoot samples from seedlings of *C. juncea* exposed to 0 mmol.L^{-1} and 0.5 mmol.L^{-1} NiCl_2 using the energy disperse X-Ray fluorescence with the radioisotopic excitation technique at the Center for Nuclear Energy in Agriculture, CENA/USP and analyzed as describe by Nascimento Filho (1999).

Enzyme Extraction: Enzyme extractions from roots and shoots of *C. juncea* seedlings were carried out at 4°C . Frozen plant tissues were ground to a fine powder in liquid nitrogen in a pestle and mortar and extracted at a ratio 1:3 (w/v) fresh weight to extraction buffer [100 mmol.L^{-1} potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mmol.L^{-1} ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 3 mmol.L^{-1} dithiothreitol (DTT) and 4% (w/v) insoluble polyvinypoly pyrrolidone (PVPP)]. The homogenate

was centrifuged in 10,000 g_n for 30 min at 4°C, to remove cell debris. The supernatant was kept stored in separate aliquots at -80°C to be used for CAT and GR analyses.

Protein determination: The protein concentration for all samples was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Enzyme assays: CAT activity was determined in a spectrophotometer as described by Azevedo et al. (1998). The assay was carried out at 25°C in a reaction mixture containing 1 mL of 100 mmol.L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.5) with 25 μ L H₂O₂ (30% solution). The reaction was initiated by the addition of 25 μ L plant enzyme sample and the activity determined by monitoring the degradation of H₂O₂ at 240 nm for a period of 1 min at 1 s intervals. CAT activity was expressed in μ mol.min⁻¹.mg⁻¹ prot.

GR activity was determined in a spectrophotometer as described by Azevedo et al. (1998). Enzyme activity was measured at 30°C in a reaction mixture consisting of 1 mL 100 mmol.L⁻¹ potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mmol.L⁻¹ 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), 1 mmol.L⁻¹ oxidized glutathione (GSSG) and 0.1 mmol.L⁻¹ nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH). The reaction was initiated by the addition of 50 μ L plant enzyme sample to the assay mixture. The rate of reduction GSSG was followed by monitoring the increasing absorbance at 412 nm for 1 min at 1 s intervals. GR activity was expressed in μ mol.min⁻¹.mg⁻¹ prot.

Lipid peroxidation: Lipid peroxidation in *C. juncea* shoots was determined by estimating the malondialdehyde (MDA) content following the method of Heath and Packer (1968) slightly modified. Fresh material (0.3 g) was macerated in 1.3 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 10,000 g_n for 5 min. For every 0.5 mL of supernatant, 2 mL of a 20% TCA solution containing 0.5% thiobarbituric acid (TBA) was added. The mixture was heated at 95°C for 30 min and then cooled quickly on ice bath. The resulting mixture was centrifuged at

10,000 g_n for 1 min and the absorbance was measured at 535 and 600 nm. Measurements were corrected for unspecific turbidity by subtracting the absorbance at 600 nm. The concentration of MDA was calculated using an extinction coefficient of $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

RESULTS AND DISCUSSION

The increased contamination and subsequent accumulation of heavy metals in the soil may have serious consequences for agriculture, since the concentration of heavy metals can reach high levels in the soil and become a limiting factor for normal plant growth (Jarup, 2003). Some metals can reduce crop yields and adversely affect soil biomass and fertility. These problems are exacerbated because heavy metals are strongly retained in the soil, with little leaching and may remain in the soil for thousands of years (Selim and Kingery, 2003). The effect of heavy metals in plants has been investigated in some detail considering several aspects of the cellular metabolism, such as chlorophyll biosynthesis (van Assche and Clijsters, 1990), nitrogen metabolism (Boussama et al., 1999a,b; Kumar and Dubey, 1999), antioxidant responses (Pereira et al., 2002) and sulphate assimilation (Lee and Leustek, 1999). However, studies related to the effect of Ni in *C. juncea* are still unknown.

Ni accumulation: Using X-ray absorption spectroscopy we have determined the accumulation of Ni in roots and shoots of *C. juncea* after growth in 0.5 mmol.L^{-1} for a period of up to 96 h (figure 1). It was verified that Ni entered the roots very rapidly with approximately 100% of the Ni being taken up within the first 24 h of growth in the presence of the metal, however, little was translocated to the upper parts of the plants. In an earlier report, the total concentration of Ni in *Trigonella corniculata* tissues increased consistently with increasing Ni concentrations applied to the roots, with the metal accumulating in much higher amounts when compared to the shoots (Parida et al., 2003). Similar behavior has also been reported for the heavy metal Cd, which can also rapidly and mainly accumulate in the roots, with little being translocated to the other parts of the plants (Vitória et al., 2001). Such a result has also been reported for *C. juncea* (Pereira et al., 2002). Furthermore,

among the several distinct proposed mechanisms for heavy metal tolerance, in the case of *Alyssum bertolonii* hairy roots, the tolerance to Ni appears to be related to the ability to withstand the effects of plasma membrane depolarisation (Boominathan and Doran, 2003). In addition, Prasad and Freitas (2000) have stated that different parts of plants have different adsorption abilities due to localization of specific ligands that have affinity to bind to a particular metal. Wang et al. (2003) studying rice plants which were grown to maturity in paddy soils contaminated with heavy metals observed that the metals could be translocated to the rice grain, with the total metal content being highly concentrated in the rice biomass, which does not appear to be the case of Ni in *C. juncea*.

Ni effect on antioxidative enzymes: Previous studies have stated that Ni cannot generate ROS directly, however, this metal could indirectly trigger oxidative stress by reactivation of proteins, including antioxidant enzymes (Boominathan and Doran, 2002). Biochemical analyses of CAT and GR enzymes were carried out in roots and shoots of *C. juncea* exposed to different NiCl₂ concentrations (0 mmol.L⁻¹, 0.05 mmol.L⁻¹ and 0.5 mmol.L⁻¹) to explore the possibility of the induction of these enzymes by Ni, which may eventually be involved in the metal tolerance mechanism in this plant species.

CAT activity in the roots was significantly affected by time of exposure and NiCl₂ concentration (prob.>F=0.0042 and prob.>F=0.190). NiCl₂ concentrations between 0 mmol.L⁻¹ and 0.05 mmol.L⁻¹ did not induce significant alterations in CAT activity during the time of exposure to this metal (figure 2A). When the 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ data are concerned, CAT activity in roots varied significantly with the time length of the treatment, adjusting to a quadratic regression (prob.>F=0.04, R²=1). These results are in agreement with *Phaseolus vulgaris*, which were grown in the presence of Cd, leading to a decline in CAT activity (Somashekaraiyah et al., 1992). The lack of any major significant alteration in CAT activity in the roots of *C. juncea* following treatment with NiCl₂ is similar to the results reported for the roots of this plant species when treated with CdCl₂ (Pereira et al., 2002).

The major function of CAT in leaves is to metabolize the H_2O_2 liberated in the peroxisomes during photorespiration following the conversion of glycollate to glyoxylate (Azevedo et al., 1998). Another class of CAT is located in vascular tissues and may be also involved in the protection against environmental stress (Willekens et al., 1995). The results showed that CAT activity in shoots (figure 2B) was significantly affected by both, time of exposure and $NiCl_2$ concentration (prob.>F=0.0002 and prob.>F=0.0293, respectively). A significant interaction between time of exposure and $NiCl_2$ concentration effect was verified (prob.>F=0.007). Furthermore, for the 0.05 $mmolL^{-1}$ $NiCl_2$ concentration, significant alterations were observed fitting a cubic regression (prob.>F=0.010, $R^2=0.99$), whereas for 0.5 $mmolL^{-1}$ $NiCl_2$ a quadratic regression ($R^2=0.82$; prob.>F=0.007) was verified.

The response of CAT activity to Al has also been shown to be dependent on the plant species and tissues analyzed (Cakmak and Horst, 1991). For instance, in soybean seedlings CAT activity was shown to be decreased in response to Al applied stress (Cakmak and Horst, 1991). In another study, the activity of CAT in young wheat leaves was impaired by an increase in Cr supply (Milone et al., 2003). Similar results in maize showed that there was an evident increase in CAT activity in response to Ni treatment (Baccouch et al., 2001). The increase in CAT activity in shoots of seedlings of *C. juncea* support the hypothesis that Ni may induce the production of H_2O_2 in the peroxisome, which is then metabolized by CAT.

GR can be located in the chloroplasts, cytoplasm and mitochondria of higher plants and is involved in the breakdown of H_2O_2 via the ascorbate-glutathione cycle (Azevedo et. al., 1998). In this work, the activity of GR was determined in roots and shoots of *C. juncea* seedlings treated with $NiCl_2$. Similarly to CAT, changes in GR activity were observed in response to the Ni induced stress in *C. juncea* seedlings (figure 3), particularly in the shoots. In roots, GR activity is drastically reduced in the control plants during the first 12 h of growth (figure 3A). A significant effect for both, time of exposure and $NiCl_2$ concentration (prob.>F=0.01, and prob.>F=0.0004, respectively), as well a significant interaction between these factors (prob.>F=0.002) have been observed. Furthermore, GR activity in the 0.05 $mmolL^{-1}$ $NiCl_2$ treatment was shown to be significantly

decreased with the statistical data adjusting to a quadratic regression (prob.>F=0.0025, R²=1.00). In the 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ concentration, seedlings were significantly affected by the concentration of NiCl₂ with the data adjusting to a linear regression (prob.>F=0.00002, R²=0.88). The results suggest the Ni concentrations tested may have had an inhibitory effect on GR activity. Ali et al. (2002) have reported similar results, showing significant decrease in GR activity in response to mercury (Hg) stress, particularly in the roots. These results may be explained by the competition of these metals with other divalent cations such as Fe and Zn, which have a role in the synthesis of GR (van Assche and Clijsters, 1990). Furthermore, the reduction in GR activity in combination to the increased CAT activity may suggest that the latter enzyme may have a more important role in the detoxification mechanism in *C. juncea* roots.

GR activity in the shoots were only affected by the time of treatment with significant alterations being detected (prob.>F=0.029), but was not significantly affected by NiCl₂ concentration (prob.>F=0.63). A different pattern was observed in *Alyssum* exposed to Ni, since GR activity was shown to increase in the Ni treatment when compared to the control, suggesting that GR activity can be involved in the Ni tolerance mechanism (Schickler and Caspi, 1999). Similar increases in GR activity were also observed in *Phaseolus vulgaris* grown in the presence of Cu, which maintained the redox status of the ascorbate and glutathione pools (Chaoui et al., 1997). In *C. juncea* plants submitted to Cd exposure, the activity of GR was increased by 6-fold in the leaves when compared to the untreated control (Pereira et al., 2002). Such an increase in GR activity suggests that GR is playing a role in the detoxification of Ni-induced ROS possibly via the glutathione-ascorbate cycle.

The majority of the studies determining the response of GR to metal exposure have shown that GR activity increases as part of the defense against the metal-induced stress, an alteration which has often been metal dose dependent and variable over time (Gratão et al., 2005). GSH is considered essential in plant cells, although some plants contain tripeptide homologs of GSH, in which the carboxy terminal glycine is replaced by other amino acids, such as homogluthathione (γ -glutamylcysteinylalanine), hydroxymethylglutathione (γ -glutamylcysteinylserine), that may partly

or totally replace GSH (Creissen et al., 1994). Another GSH homologue, γ -glutamylcysteinylglutamate, was discovered in maize seedlings exposed to Cd (Prasad, 1997). The oxidized forms of GSH homologues can be reduced by yeast glutathione reductase (GR), suggesting similar physiological and biochemical roles to the more widespread GSH (Noctor and Foyer, 1998). Such a result suggests that this enzyme is responding to metal stress by maintaining glutathione in the reduced form prior to incorporation into phytochelatins (PCs), and/or via the activation of the ascorbate-glutathione cycle for the removal of H_2O_2 (Gratão et al., 2005). This information appears to be also valid to CAT and other antioxidant enzymes, since the responses vary according to the metal, plant species, concentration of the metal and even plant tissues.

Ni effect on free amino acids: The effect of Ni on the pool of total free amino acids was recently investigated in *Alyssum* (Briat and Lebrun, 1999). The results showed that amino acids and their derivatives also play an important role in plant metal homeostasis and when these systems are overloaded, oxidative stress defense mechanisms are activated. For example, Cu exposure affected water flux and ion transport in rice seedlings and an excess of Cu led to a large reduction in proline content and malfunction of the Cu transport barrier in rice roots (Chen et al., 2004).

In order to better understand the biochemical responses of *C. juncea* to Ni, free amino acid analysis was carried out in roots and shoots of *C. juncea* seedlings. It was observed in roots that $NiCl_2$ caused a decrease in the total free amino acids content, but only after 96 h of treatment, whereas the control varied little (Table 1). In shoots, the total free amino acid pool was relatively constant in the Ni treatment, although slightly lower when compared to the control up to 48 h of treatment, but with a significant increase after 96 h of treatment (Table 1). Based on these results, it is difficult to establish a direct effect of $NiCl_2$ on the free amino acid pool, at least in *C. juncea* and under the conditions of this research. Consequently, it appears that amino acids are not directly related to a metal-specific tolerance response to Ni in *C. juncea*, even though Ni accumulation of all free amino acids in roots of soybean seedlings grown in the presence of Ni have been demonstrated previously (Shintinawt and Ansary, 2000).

Lipid peroxidation: Lipid peroxidation is associated with oxidative stress and contributes to the breakdown of the functional and structural integrity of biological membranes, resulting in increases in the permeability of the plasma membrane, which leads to leakage of K^+ ions and other solutes, amino acids oxidation and eventually may cause cell death (Gratão et al., 2005). The ROS production can react with unsaturated fatty acids to cause peroxidation of essential lipids in the membranes of intracellular organelles. Moreover, H_2O_2 can accumulate in plant tissues where the antioxidants activities are suppressed (Scandalios, 1993). Malondialdehyde (MDA) is one of several low molecular weight end products formed via decomposition of certain primary and secondary lipid peroxidation products (Liu et al., 1997). Pandolfin et al. (1996) suggested that Ni induces lipid peroxidation, degrading membrane lipids and causing conformational changes in membrane proteins. In this work, lipid peroxidation was monitored by measuring the concentration of MDA in shoots of control and 0.5 mmol.L^{-1} $NiCl_2$ treated seedlings. The degree of lipid peroxidation varied very little in shoots of control plants, however, a steady almost linear increase in MDA was observed for the Ni treatment, clearly indicating a Ni-induced oxidative stress in *C. juncea* seedlings shoots (figure 4). Such a result is in agreement with those obtained by Baccouch et al. (2001) who showed that Ni oxidative disorder is part of the overall expression of Ni toxicity in roots of maize with enhanced lipid peroxidation.

In this study, the growth of *C. juncea* roots was essentially very little affected by Ni (data not shown), however, the physiological parameters analyzed to investigate oxidative stress indicated that ROS are being produced, leading to lipid peroxidation. Although variation in CAT and GR activities were observed, a clear and defined trend was not defined, therefore, it is not possible with these results to suggest the main enzymatic system which could be involved in the dismutation of the ROS being produced, but it appears that although Ni accumulation is occurring mainly in the roots, its effect is being transmitted to the upper parts of the plants and H_2O_2 is being produced and likely of being dismutated by CAT. Furthermore, a more detailed study would be necessary, which would necessarily involve the investigation of other enzymatic systems and non-

enzymatic systems. The only previous report for *C. juncea* in relation to heavy metal induced oxidative stress was carried out with Cd, with a more clear response being obtained, indicating that GR appears to be in the main line of antioxidative defense in this plant species when Cd induced oxidative stress is concerned (Pereira et al., 2002).

REFERENCES

- Ali BM, Chun HS, Lee CB (2002) Response of antioxidant enzymes in rice (*Oryza sativa*) under mercury stress. *J. Plant. Biol.* 45:141-147.
- Azevedo RA, Damerval C, Landry J, Lea PJ, Bellato CM, Meinhardt LW, Le Guilloux M, Delhaye S, Toro AA, Gaziola SA, Berdejo BDA (2003) Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury Mutations. *Eur. J. Biochem.* 270:4898-4908.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith PJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104:280-292.
- Barcan V, Kovnatsky E (1998) Soil surface geochemical anomaly around the copper-nickel metallurgical smelter. *Water Soil Poll.* 103:197-218.
- Baccouch S, Chaoui El, Ferjani E (2001) Nickel-induced oxidative damage in *Zea mays* shoots. *J. Plant. Nutr.* 7:1085-1097.
- Berglund S, Davis RD and L'Hermite P (1984) Utilization of sewage sludge on land: rates of application and long-term effects of metals, 216 p., Reidel Publishing.
- Boominathan R, Doran PM (2002) Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol.* 156:205-215.
- Boussama N, Ouariti O, Ghorbal MH (1999a) Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *J. Plant. Nutr.* 22:731-752.
- Boussama N, Ouariti O, Suzuki A, Ghorbal MH (1999b) Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant. Physiol.* 55:310-317.

- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brej T (1998) Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. populations from the legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta. Soc. Bot. Pol.* 67:325-333.
- Briat JF, Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *Cr. Acad. Sci. Iii-Vie.* 322:43-54.
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase-activities in root-tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83:463-468.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorgbal MH, El Ferjani (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127:139-147.
- Chen CT, Lo KF, Chiu CY (2004) Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant. Sci.* 166:103-111.
- Creissen GP, Edwards EA and Mullineaux PM (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: Foyer CH, Mullineaux, PM (eds), *Causes of Photooxidative Stress and amelioration of defense systems in plants*, pp. 343-364. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dudka S, Miller WP (1999) Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to the human food chain. *J. Environ. Sci.* 34:681-708.
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plantarum* 119:355-364.
- Gerendas J, Polacco JC, Freyermuth SK, Sattelmacher B (1999) Significance of nickel for plant growth and metabolism. *J. Plant. Nutr. Soil Sc.* 162:241-256.
- Gratão PL, Pompeu GB, Cardoso PF, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Plant antioxidative responses to toxic elements. *Curr. Top. Biochem. Res.*, in press.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:2141-2145.

- Hegedus A, Erdei S, Horvath G (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160:1085-1093.
- Hoagland DR, Arnon D. (1953) The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station University of California Berkeley, Circ. 347.
- Jarup L (2003) Hazards of heavy metal contamination, *Brit. Med. Bull*, 68:167-182.
- Koricheva J, Roy S, Vranjic JA, Haukioja E, Hughes PR, Hänninen O (1997) Antioxidant response to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. *Environ. Pollut.* 95:249-258.
- Kumar RG, Dubey RS (1999) Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. *J. Plant. Physiol.* 155:118-121.
- Küpper H, Setlík I, Setliková E, Ferimazova N, Spiller M and Küpper FC (2003) Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Funct. Plant. Biol.* 30:1187-1196.
- Lee SM, Leustek T (1999) The effect of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant. Sci.* 141:201-207.
- Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN (1997) Heavy metal separation by functionalized mesoporous materials. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 214:90-91.
- Milone MT, Sgherri C, Clijster H, Navari-Izzo F (2003) Antioxidant responses of wheat treatment with realistic concentration of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 50:265-276.
- Nascimento Filho V (1999) Técnicas Analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF), 32p., Piracicaba, ESALQ-USP.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
- Pandolfi T, Gabbriellini R, Ciscato N (1996) Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. *J. Plant. Nutr.* 19:1611-1627.

- Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK (2003) Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Sci. Hortic. Amsterdam* 98:113-119.
- Pereira GJG, Molina SMG, Lea PJ, Azevedo RA (2002) Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *C. juncea*. *Plant Soil*. 239:123-132.
- Polidoros AN, Scandalios JG (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant*. 106:112-120.
- Poulik Z (1997) The danger of cumulation of nickel in cereals on contaminated soil. *Agr. Ecosyst. Environ*. 63:25-29.
- Prasad MNV, Freitas H (2000) Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak). *Environ. Pollut*. 110:277-283.
- Prasad MNV (1997) *Plant Ecophysiology* (Ed: J. Wiley and Sons). NY, pp. 542.
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*. 101:7-12.
- Schickler H, Caspi H (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant*. 105:39-44.
- Selim HM, Kingery WL (eds) (2003) *Geochemical and Hydrological Reactivity of Heavy Metals in Soils*, 360p. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Shintinawt FE, Ansary AE (2000) Differential effect of Cd⁺² and Ni⁺² on amino acid metabolism in soybean seedlings. *Biol. Plant*. 43:79-84.
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant*. 85:85-89.
- Stroinski A, Kozłowska M (1999) Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Soc. Bot. Pol*. 66:189-195.
- Surai PF (2002) Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity *World's Poultry Sci. J*. 58:333-336.

Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13:195-206.

Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.* 114:11-18.

Vitória AP, Lea JP, Azevedo, RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissue. *Phytochemistry* 57:701-710.

Wang QR, Cui YS, Liu XM, Dong YT, Christie P (2003) Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J. Environ. Sci. Heal A.* 38:823-838.

Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Mol. Breeding* 1:207-228.

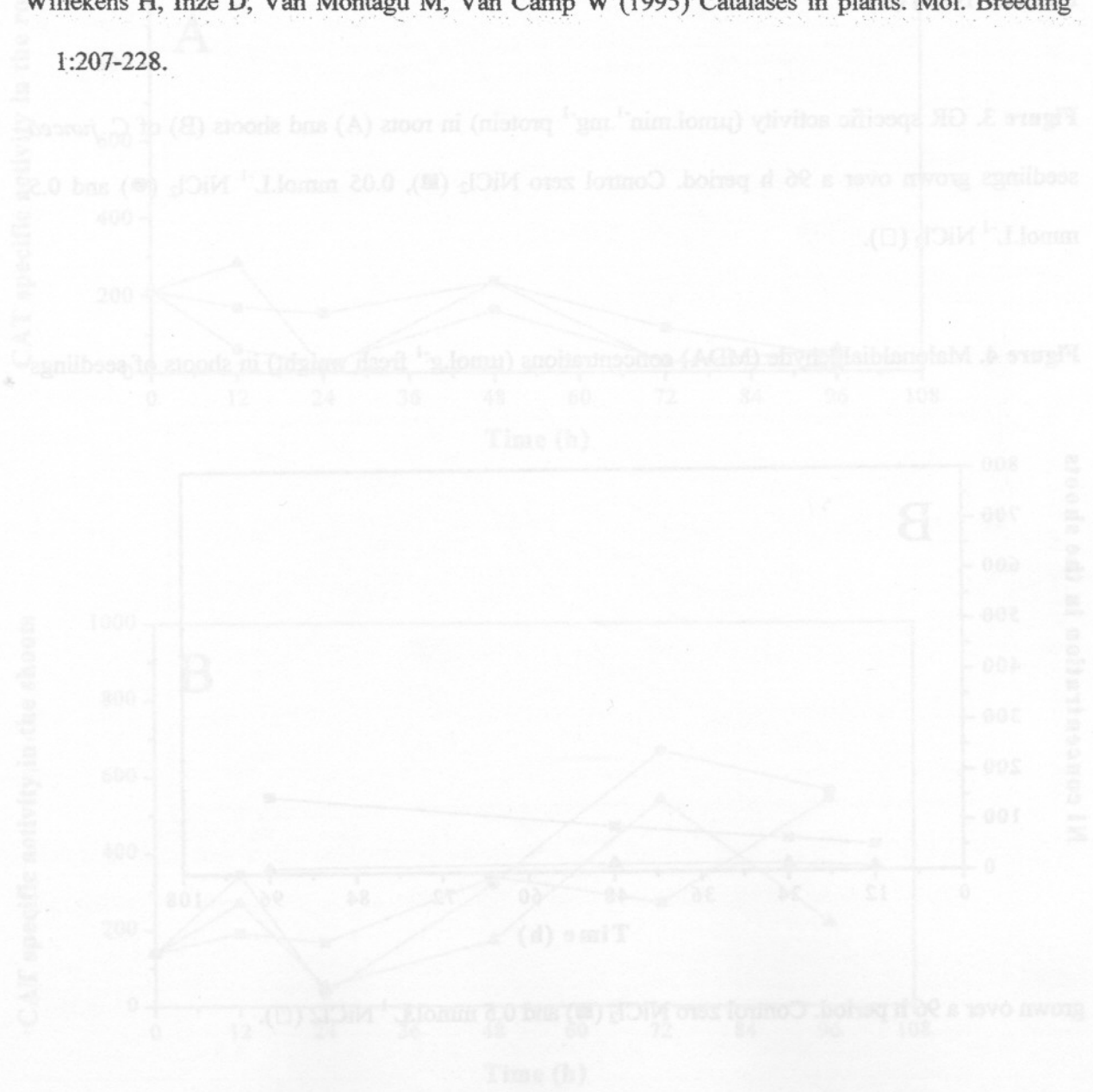


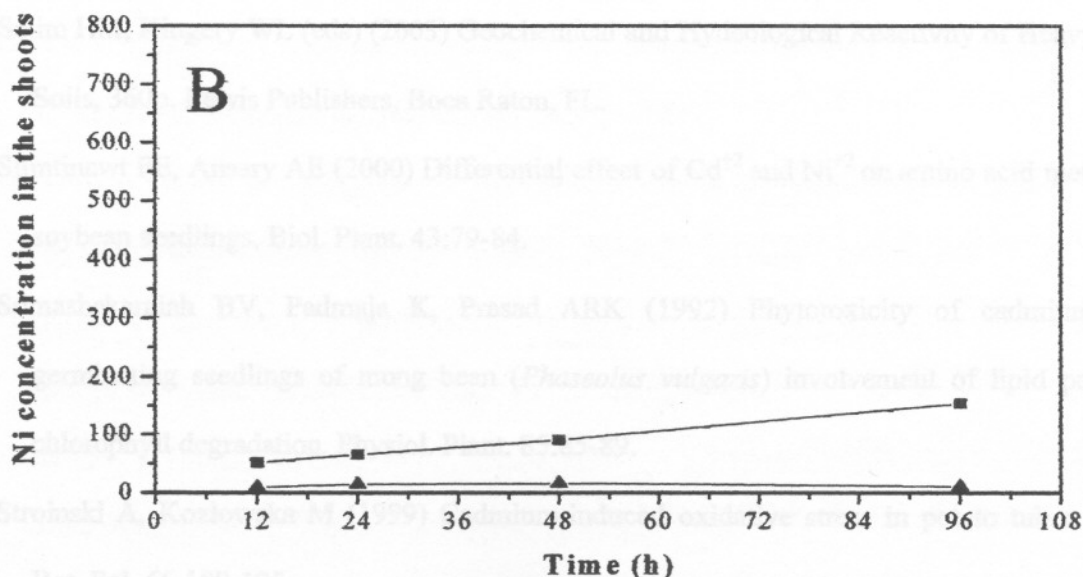
Figure Legends

Figure 1. Ni accumulation (ppm) in *C. juncea* seedlings. Ni concentrations were determined in the roots (A) and shoots (B) of seedlings grown over a 96 h period. Control zero NiCl₂ (■) and 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (□).

Figure 2. CAT specific activity (μmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein) in roots (A) and shoots (B) of *C. juncea* seedlings grown for a 96 h period. Control zero NiCl₂ (■), 0.05 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (●) and 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (□).

Figure 3. GR specific activity (μmol.min⁻¹.mg⁻¹ protein) in roots (A) and shoots (B) of *C. juncea* seedlings grown over a 96 h period. Control zero NiCl₂ (■), 0.05 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (●) and 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (□).

Figure 4. Malonaldehyde (MDA) concentrations (μmol.g⁻¹ fresh weight) in shoots of seedlings



grown over a 96 h period. Control zero NiCl₂ (■) and 0.5 mmol.L⁻¹ NiCl₂ (□).

Figure 2

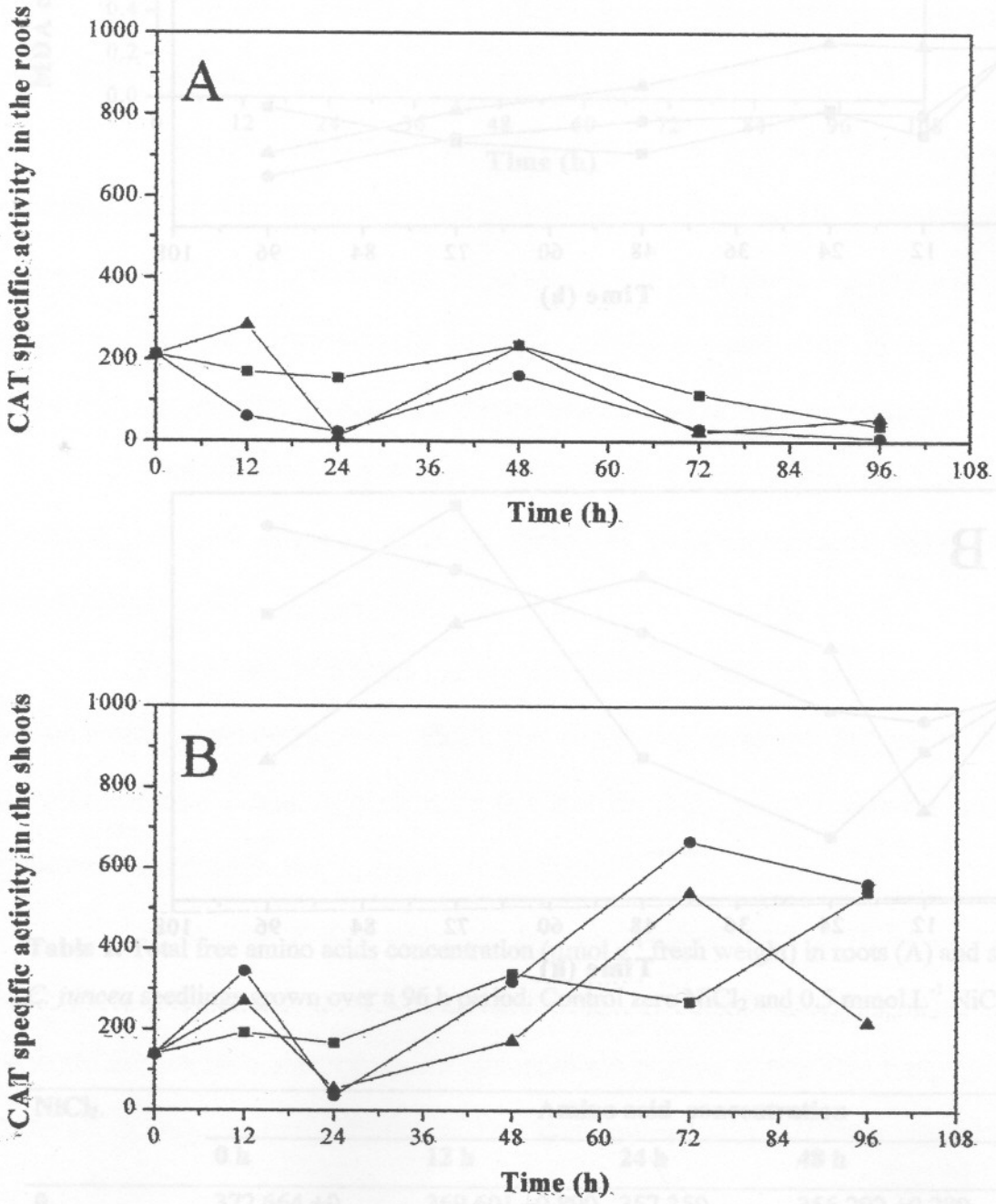


Figure 3

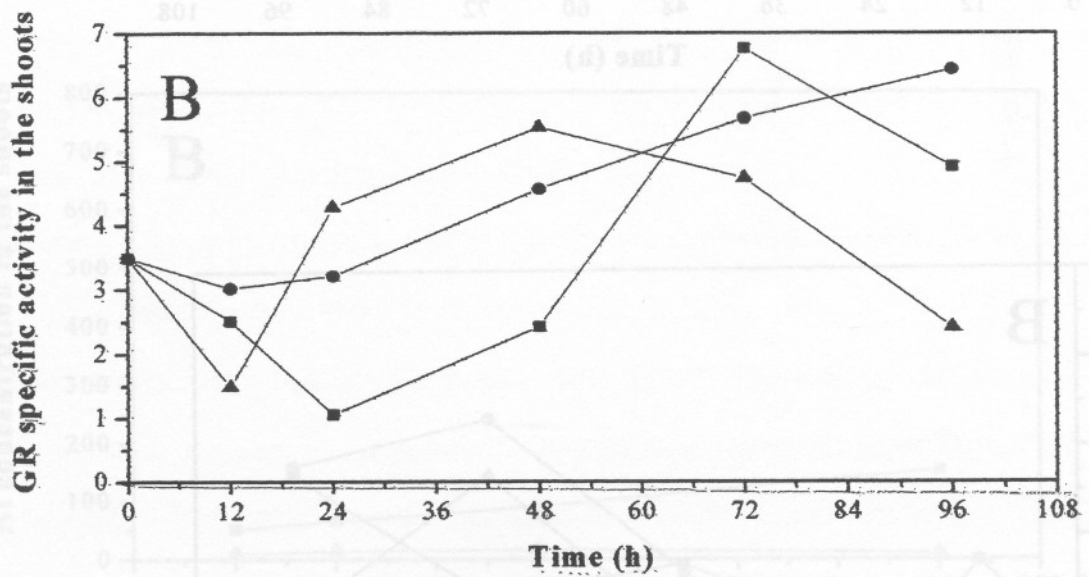
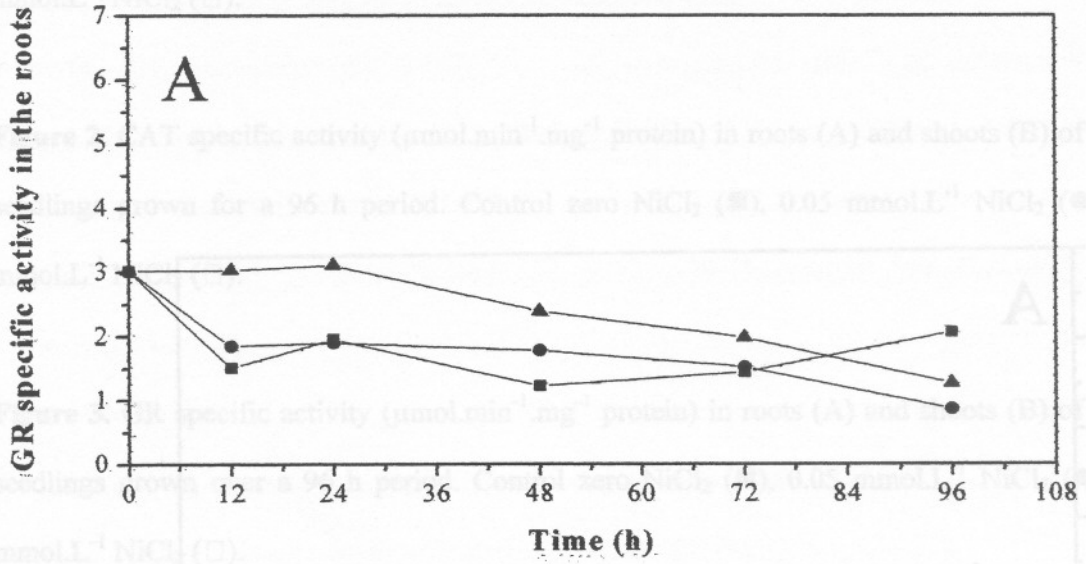
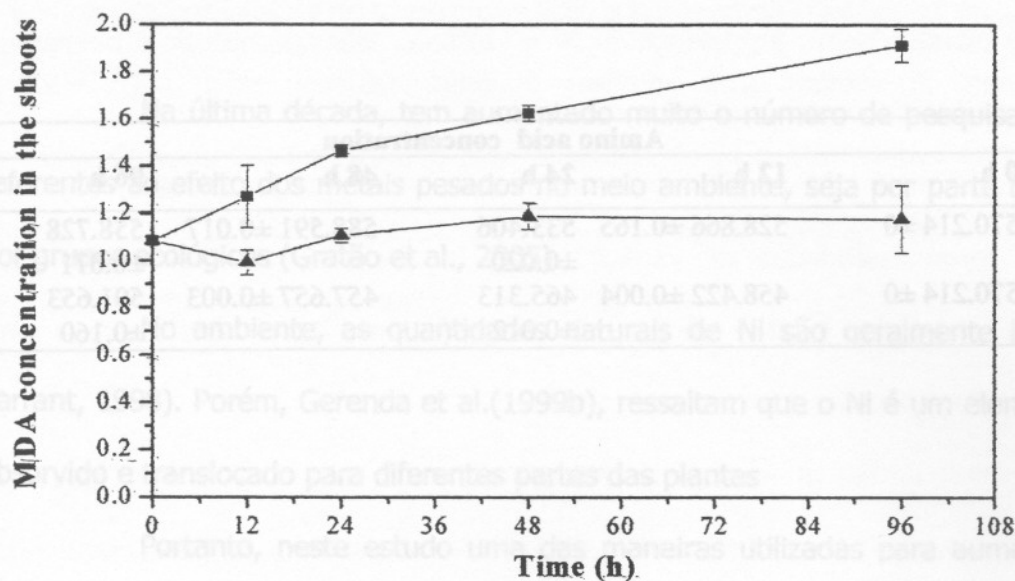


Figure 4



dos resultados obtidos nos outros ensaios realizados, sobre o efeito da exposição ao Ni sobre o desenvolvimento das plântulas de *C. juncea* foi a técnica de Fluorescência de Raios X que permitiu quantificar a concentração de NiCl_2 (0 mM e 0,5 mM), nos períodos de 12 h, 24h, 48h e 96 h ao longo das estruturas das plântulas de crotalaria (raízes e parte aérea).

É importante ressaltar que a análise deste estudo foi realizada a partir de 12 h de exposição, uma vez que a partir deste horário foi possível realizar a determinação do Ni nestas plântulas.

Nos resultados obtidos nos ensaios do tratamento sem aplicação de Ni, observou-se que a quantidade dessa metal reduziu com o decorrer do tempo de tratamento nas raízes. No entanto, com a aplicação da dose 0,5 mM de NiCl_2 pode-se verificar uma tendência crescente da absorção do elemento Ni neste órgão.

Table 1. Total free amino acids concentration ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ fresh weight) in roots (A) and shoots (B) of *C. juncea* seedlings grown over a 96 h period. Control zero NiCl_2 and 0.5 mmol.L^{-1} NiCl_2 .

NiCl_2	Amino acid concentration				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
0	372.664 \pm 0	369.601 \pm 0.890	357.350	356.202 \pm 0.289	383.384

			± 0.280		± 1.200
0.5	372.664 ± 0	432.899 ± 0.280	330.934	338.974 ± 0.580	191.960
			± 2.350		± 0.120

NiCl₂	Amino acid concentration				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
0	570.214 ± 0	528.866 ± 0.165	533.406	588.591 ± 0.017	558.728
			± 0.020		± 0.071
0.5	570.214 ± 0	458.422 ± 0.004	465.313	457.657 ± 0.003	591.653
			± 0.012		± 0.160

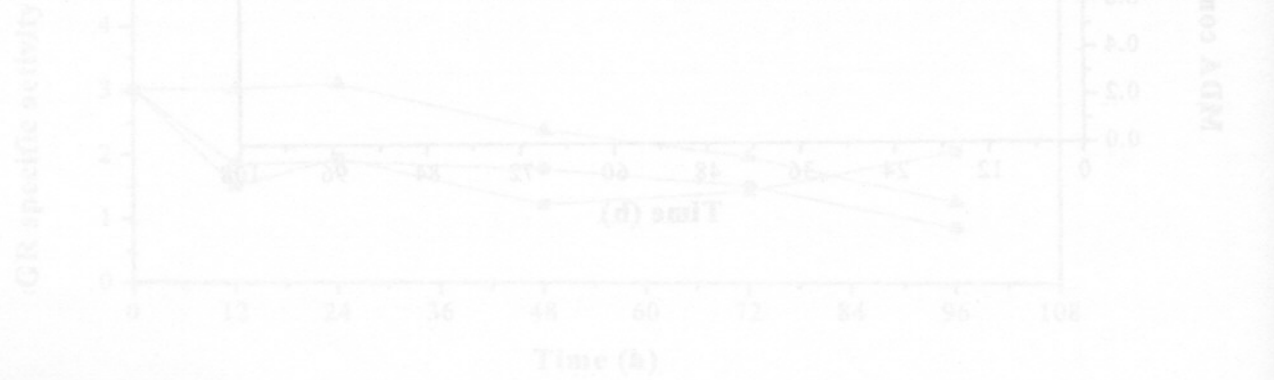


Table 1. Total free amino acids concentration ($\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight) in roots (A) and shoots (B) of *C. japonica* seedlings grown over a 96 h period. Control zero NiCl₂ and 0.5 mmol L⁻¹ NiCl₂.

NiCl ₂	Amino acid concentration				
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
0	372.664 ± 0	369.601 ± 0.820	357.350	356.205 ± 0.289	383.384
0.5	372.664 ± 0	356.205 ± 0.289	357.350	356.205 ± 0.289	383.384

5.3-Análise da concentração de Ni nos tecidos vegetais das plantas

Na última década, tem aumentado muito o número de pesquisas e informações referentes ao efeito dos metais pesados no meio ambiente, seja por parte dos cientistas ou por grupos ecológicos (Gratão et al., 2005).

No ambiente, as quantidades naturais de Ni são geralmente baixas (Malan & Farrant, 1998). Porém, Gerendas et al.(1999b), ressaltam que o Ni é um elemento facilmente absorvido e translocado para diferentes partes das plantas.

Portanto, neste estudo uma das maneiras utilizadas para aumentar a precisão dos resultados obtidos nos outros ensaios realizados, sobre o efeito da exposição ao Ni sobre o desenvolvimento das plântulas de *C. juncea* foi a técnica de Fluorescência de Raios X que permitiu quantificar a concentração de NiCl₂ (0 mM e 0,5 mM), nos períodos de 12 h, 24h, 48h e 96 h ao longo das estruturas das plântulas de crotalaria (raízes e parte aérea).

É importante ressaltar que a análise deste estudo foi realizada a partir de 12 h de exposição, uma vez que a partir deste horário foi possível realizar a determinação do Ni nestas plântulas.

Nos resultados obtidos nos ensaios do tratamento sem aplicação de Ni, observou-se que a quantidade deste metal reduziu com o decorrer do tempo de tratamento nas raízes. No entanto, com a aplicação da dose 0,5 mM de NiCl₂ pode-se verificar uma tendência crescente da absorção do elemento Ni neste órgão.

Entretanto, muitas pesquisas têm demonstrado que o Ni se relaciona com a absorção de outros elementos minerais nas plantas, gerando efeitos sinérgicos e antagônicos, podendo influenciar a absorção deste elemento em plantas (Pandolfin et al., 1996). Palácios & Mataix (1999), por exemplo, observaram que em tomate o Ni⁺² inibe competitivamente a

absorção de Fe^{+2} e Zn^{+2} . Neste caso, a indisponibilidade de Fe nos tecidos inibe o metabolismo desta planta. Assim, a presença do Ni no tomate, além de reduzir a biomassa dos frutos, tornou prejudicial o consumo dos mesmos.

Para obter mais informações sobre a influência do Ni nestas plantas, a partir destas amostras, foram estudadas as variações nas intensidades de distribuição dos elementos Fe e Zn associados a estas plântulas de crotalaria em raízes e na parte aérea em função dos tratamentos aplicados com o metal pesado.

Estes micronutrientes foram escolhidos para este estudo, uma vez que foi relatado em pesquisa que um dos sintomas da toxicidade de metais pesados, particularmente do Ni, é uma clorose característica da deficiência do Fe (Pandolfin et al., 1996), e em alguns trabalhos, como em *Rubiaceas* após a aplicação do Ni, foram observadas alterações na concentração de Zn nestas plantas (Boyd et al., 1999).

Nos resultados obtidos neste estudo, observou-se que o Ni exerceu influências diferenciáveis na concentração e distribuição de Fe.

Nesta análise realizada para a parte aérea destas plântulas de *C. juncea*, foram observadas baixas concentrações de Fe nas plântulas controle, por outro lado foram evidenciadas proporções menores deste elemento absorvido, com a aplicação da concentração 0,5 mM de NiCl_2 nesta região a partir de 24 h, sendo mantido o mesmo padrão da distribuição de Fe até 96 h (Figura 6). O Cd, de forma semelhante, interferiu na disponibilidade de K^{+2} , Mg^{+2} e Fe^{+2} em plantas (Shukla et al., 2003). Em pepino, analisou-se o efeito da aplicação de Pb nesta planta e foi observado que este metal influenciou na absorção de micronutrientes (An et al., 2004).

Em espinafre, após aplicação de Selênio (Se), notou-se a alta concentração deste elemento na biomassa desta planta como também que este metal inibiu a absorção de Fe

(Hawrylak & Szymanska, 2004). De forma semelhante, o Cu também causou a deficiência de Fe em plantas por inibição de sua translocação à parte aérea (Kintzion et al., 2003).

Em outra pesquisa, também realizada com pepino, foi constatada a baixa absorção de Fe e Ca, influenciada pela presença do Ni nesta planta (Varga et al., 1999). Clarkson & Lüttge.(1989), mostraram que em muitas espécies de plantas o Ni inibiu competitivamente a absorção de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} e Zn^{+2} .

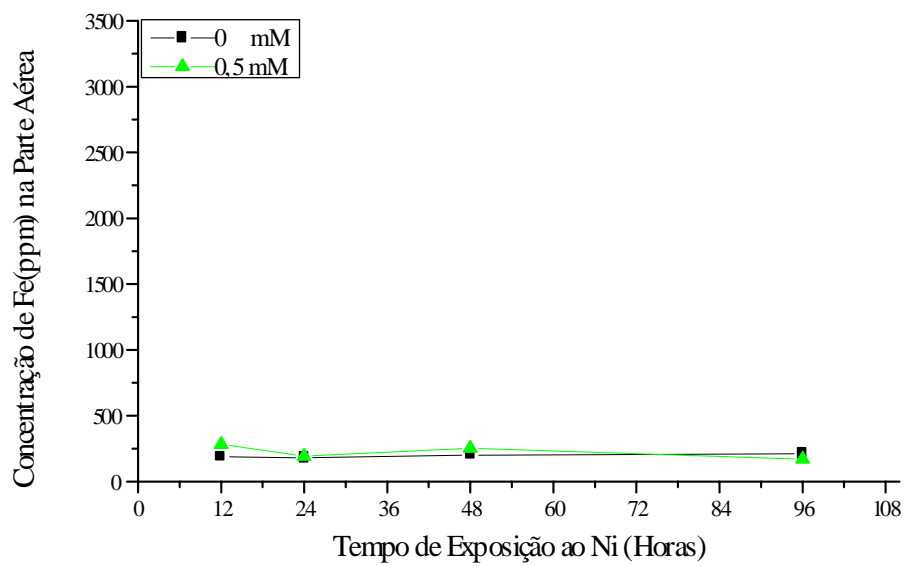


Figura 6. Quantidade de Ferro acumulado na parte aérea de plântulas de Crotalaria em função da aplicação de dose de Níquel.

Em relação à influência do Ni no teor do Fe em raízes, verificou-se que houve diferença na distribuição deste micronutriente após aplicação do metal e as plantas controle, que não receberam este metal. Deve-se ainda considerar que às 48 h do tratamento constatou-se uma alteração no padrão de distribuição de Fe nesta raízes (Figura 7). Em plantas de espinafre após aplicação de doses de Ni e Hg, fora constatadas maiores concentrações destes metais em suas raízes, entretanto foi verificado que estas plantas não apresentaram redução em seu desenvolvimento (Chunilall et al., 2004). Em *Indian mustard*, observou-se que o Cd inibiu competitivamente a absorção de Ca, Fe e K (Jiang et al., 2004). Em rabanete, a absorção de Fe foi influenciada pela disponibilidade de Pb (Larbi et al., 2002). Em *Brassica juncea*, também observou-se que o excesso de S, além de provocar efeitos de toxidez nesta planta, inibiu a absorção de micronutrientes (Cui et al., 2003).

Neste estudo, comparando os tecidos de raízes e parte aérea em plantas de *C. juncea*, observou-se que os teores de Fe nas raízes foram maiores que os obtidos na parte aérea após a aplicação do Ni nesta planta. Aparentemente, o Ni interferiu na transporte de Fe e inibiu o seu metabolismo nesta planta. Comportamento semelhante foi observado em *Trigonella corniculata*; após a aplicação de Ni nesta planta, foi constatada uma maior concentração de Fe nas raízes quando comparado com a presença deste elemento na parte aérea (Parida et al., 2003).

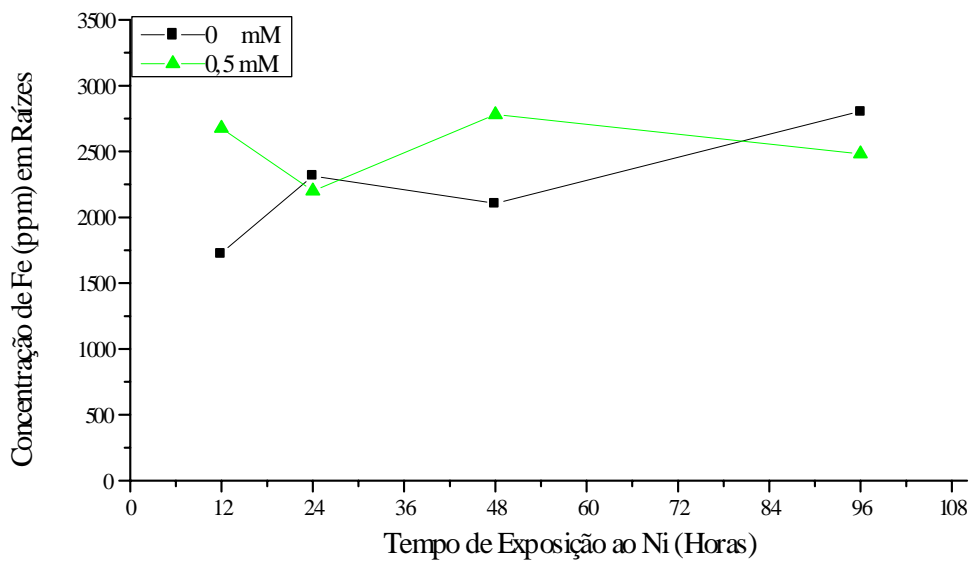


Figura 7. Quantidade de Ferro acumulado em raízes de plântulas de crotalaria em função da aplicação de dose de Níquel.

O Zn participa na estrutura e funcionamento de diferentes processos metabólicos em plantas (Panda & Sahu, 1999). Estes autores, constataram que em arroz, a ausência deste micronutriente ocasionou a redução no crescimento da planta e do conteúdo de clorofila.

Por este motivo, neste estudo também procurou-se verificar o efeito da concentração de Zn com a aplicação do NiCl_2 nestas plantas.

Nesta análise observou-se que as doses de Ni diminuíram a assimilação de Zn na parte aérea, a partir do período de 24 h de tratamento, comparando-se com as plântulas controle que não receberam este metal (Figura 8). Entretanto, a partir de 48 h verificou-se na parte aérea um restabelecimento da concentração de Zn quando comparado com plântulas controle. Isso indicou a existência de inibição competitiva na absorção de Zn pelo Ni. Em *Brassica oleracea*, foi constatada que a absorção e translocação de Cu, Zn e Fe foram inibidas pela presença de Ni (Yang et al., 1996). Em *Brassica napus*, após a aplicação de doses de Cu, constatou-se o aumento da concentração deste metal pesado nas raízes desta planta. No entanto, o Zn mostrou comportamento contrário, ou seja, foi observado aumento da concentração deste micronutriente na parte aérea (Rossi et al., 2004). Por outro lado, em milho, ao ser estudado o efeito do Ni sobre os micronutrientes Fe e Zn, verificou-se a inibição da absorção destes elementos devido à presença desse metal (Brkic et al., 2004), o que está de acordo com os resultados observados neste trabalho.

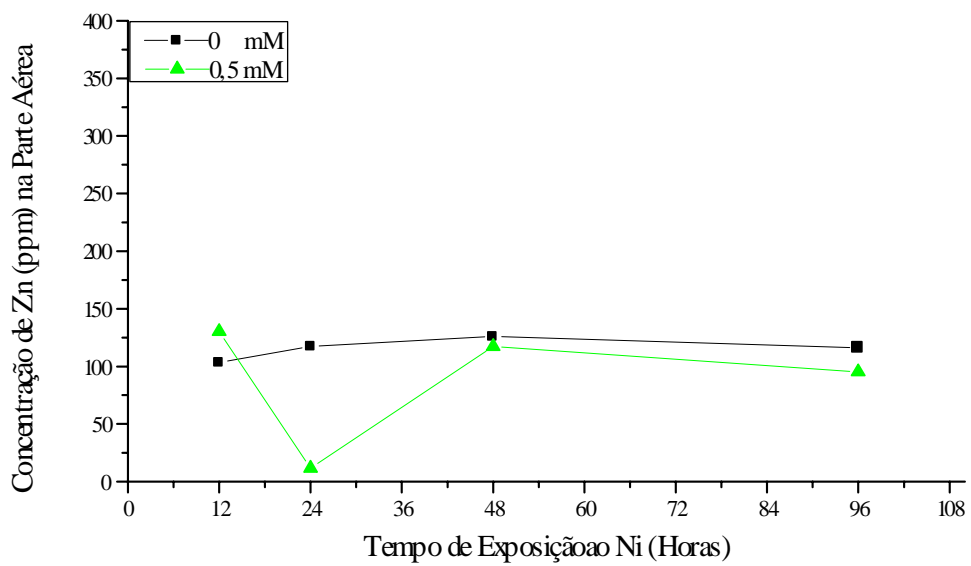


Figura 8. Quantidade de Zn acumulado na parte aérea de plântulas de Crotalaria em função da aplicação de dose de Níquel.

Também, a quantificação de Zn nas raízes apresentou variações significativas durante o período de tratamento com o Ni. No período de 12 h, observou-se um aumento da concentração de Zn nesta parte da planta, seguido de uma variação de comportamento de distribuição deste elemento na dose aplicada de 0,5 mM de NiCl₂ (Figura 9).

O que sugere que o Ni durante o tratamento, agiu na inibição competitiva da absorção e transporte de Zn para parte aérea das plantas de *C. juncea*.

Comportamento semelhante foi constatado em *Cajanus cajan*, em que foi verificado um acréscimo na concentração de Zn em raízes, após a aplicação de Ni no tratamento e inibição da sua participação na parte aérea desta planta (Rao & Sresty, 2000)

Deve-se realçar que em trigo, após aplicação de herbicida, observou-se aumento da concentração de Zn nas amostras das raízes desta planta (Wheal et al., 1998). Entretanto em gramíneas, a aplicação de doses de urânio inibiu o processo de absorção de nutrientes (Meyer et al., 2004). Em trigo, de forma semelhante, aos resultados obtidos com a disponibilidade do Ni nesta planta, houve inibição competitiva na absorção do Zn (Pandolfin et al., 1996).

Realmente, segundo Kastori et al.(1992) o acúmulo de metais pesados se faz preferencialmente nas raízes do que na parte aérea de plantas.

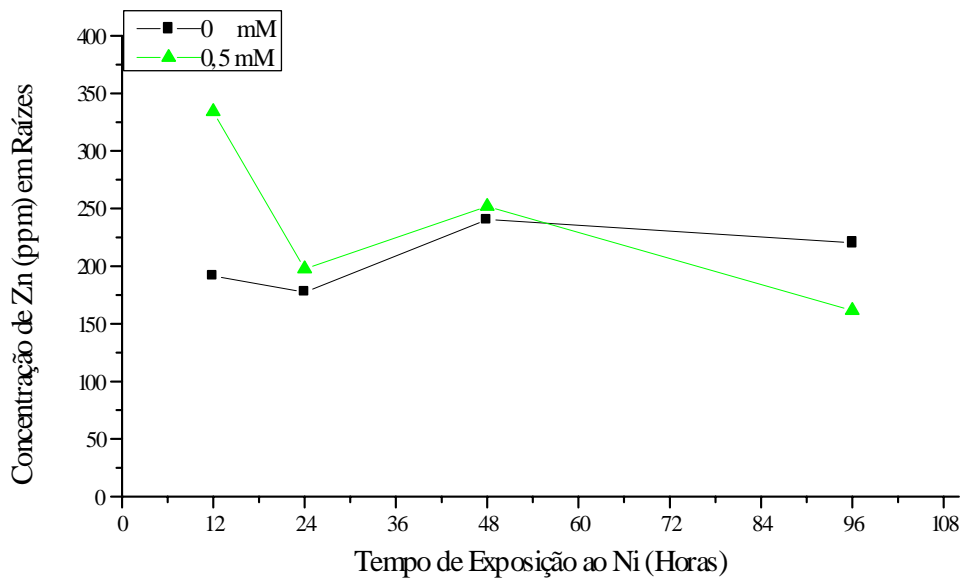


Figura 9. Quantidade de Zn acumulado em raízes de plântulas de Crotalaria em função da aplicação de dose de Níquel.

5.4-Análises bioquímicas

A sobrevivência e crescimento destas plantas na presença ao Ni são resultados dos processos adaptativos tais como enzimáticos ou síntese de solutos compatíveis para o reparo celular (Briat & Lebrun, 1999). De acordo com estes autores, os aminoácidos sob condições de estresse, podem ser acumulados em concentrações elevadas e podem contribuir para a habilidade da cultivar tolerar o estresse devido à exposição ao metal pesado.

Para o estudo do comportamento de aminoácidos na presença do metal pesado Ni, foi conduzido um ensaio bioquímico para determinação das concentrações de aminoácidos solúveis totais para parte aérea e para raízes de plântulas de crotálias submetidas a diferentes concentrações de NiCl₂ (0 mM e 0,5 mM) nos períodos de 0 h, 12 h, 24 h, 48 h e 96 h.

Os resultados obtidos relativos na quantificação dos aminoácidos em plântulas de crotalaria em ambos os tecidos analisados, demonstraram que houve mínima variação no padrão desses aminoácidos, considerando-se o tempo de exposição ao NiCl₂ nestes tratamentos.

Dando continuidade a estes estudos, neste trabalho analisou-se qualitativamente os níveis dos aminoácidos histidina e prolina em relação ao total destes aminoácidos destas amostras. Estes aminoácidos foram utilizados, uma vez que em alguns trabalhos foram observados níveis elevados destes aminoácidos na presença de metais pesados. Por exemplo, Lesko et al. (2001) ao estudarem o efeito do Cd em plantas, constataram que aminoácidos como alanina, histidina e prolina, participavam nos mecanismos de tolerância ao estresse induzido por este metal.

Nos estudos conduzidos em *Alysum lesbiacum*, por Kramer et al. (1996), foi verificado que na presença de concentrações tóxicas de Ni, a histina foi responsável pelo aumento da biomassa desta planta e inibição do efeito deste metal no crescimento das raízes. Estes autores realizaram um amplo estudo sobre o efeito do Ni por plantas e concluíram que em *Thaspi goesingese*, a histidina foi capaz de inibir a ação do Ni sobre o desenvolvimento desta planta. A partir destes estudos, estes autores sugerem que este aminoácido possui um importante papel no processo de defesa desta planta. Em *Alnus glutinosa*, foi observado que a histidina, participou no processo de tolerância ao Ni evitando a necrose das folhas desta planta (Wheeler et al., 2001). Outra pesquisa realizada em soja, também demonstrou o efeito da histina na retenção do Cd e Ni (El-Shintinawy & El-Ansary, 2000).

Pesquisas têm mostrado que a prolina atua no processo de sobrevivência de plantas em diferentes situações de estresse (Roy & Bera, 2002). Em *Lemna minor* em tratamentos que receberam Pb, foi constatado após a aplicação deste metal, a alta concentração de prolina nesta planta (Mohan & Hosetti, 1997). Em folhas de *Albizia lebbek*, a quantidade acumulada de prolina aumentou com a aplicação de doses de Ni (Tripathi & Tripathi, 1999). A aplicação de Cd em trigo, provocou alterações na concentração de prolina (Öncel et al., 2000). Também em uma pesquisa realizada em arroz, foi constatado a variação na concentração de prolina na parte aérea após a exposição desta planta ao Cu (Chen et al., 2000).

Com este propósito foi realizada uma separação deste aminoácidos por T.L.C (Figuras 10 e 11), nas concentrações de NiCl_2 (0 mM e 0,5 mM) e nos períodos de 12 h, 24 h, 48 h e 96 h.

Pela Figura 10, observou-se a presença de histidina nestas plântulas que foram submetidas a uma concentração mais alta de NiCl_2 . No caso da prolina, também houve a presença deste aminoácido nestas plântulas (Figuras 10 e 11).

Se tivéssemos realizado uma análise qualitativamente destes aminoácidos por HPLC, poderíamos certamente chegar à constatação da sua concentração específica e que devem estar intrinsecamente ligados à remoção do Ni nesta planta.

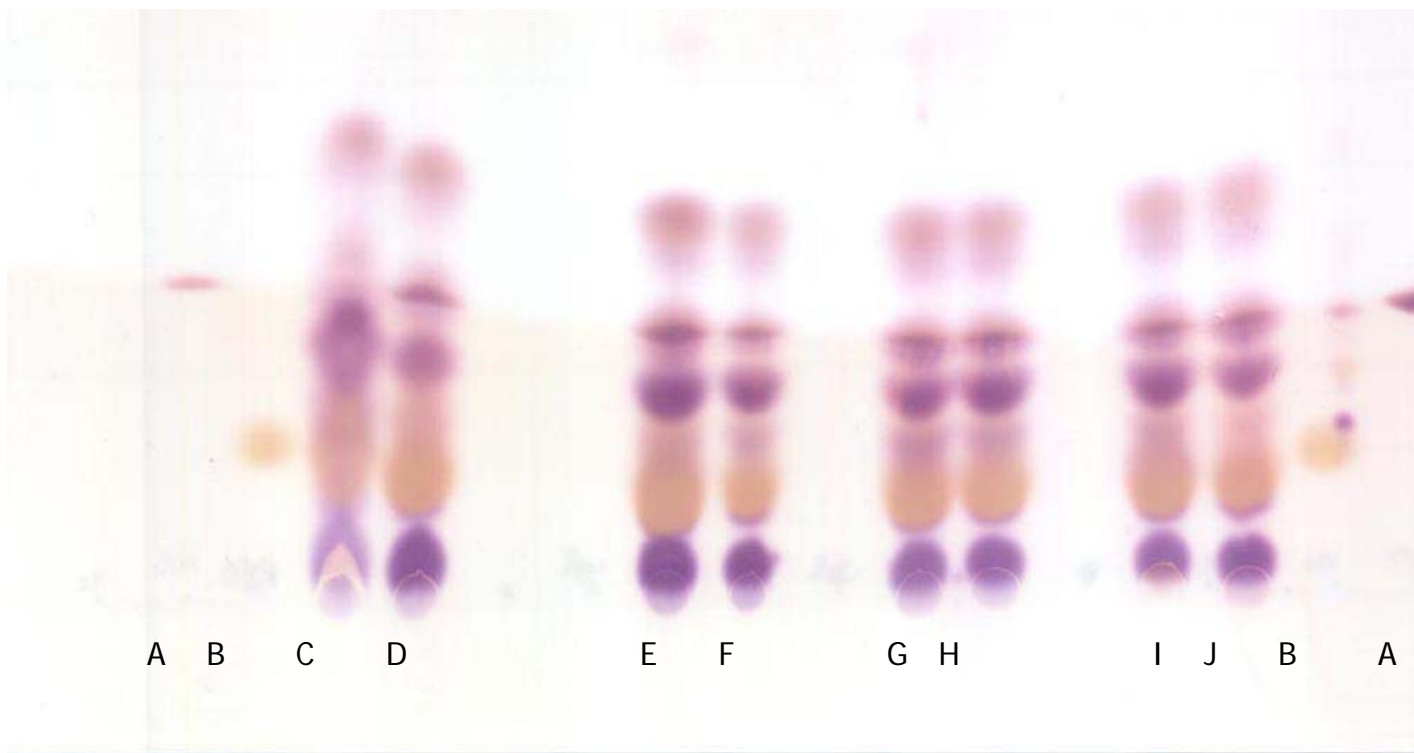


Figura 10. Análise de Histidina e Prolina na parte aérea de plântulas de *C.juncea* por T.L.C

- A) Padrão do Aminoácido Histidina
- B) Padrão do Aminoácido Prolina
- C) 0 mM 12 H
- D) 0,5 mM 12 H
- E) 0 mM 24 H
- F) 0,5 mM 24 H
- G) 0 mM 48 H
- H) 0,5 mM 48 H
- I) 0 mM 96 H
- J) 0,5 mM 96 H

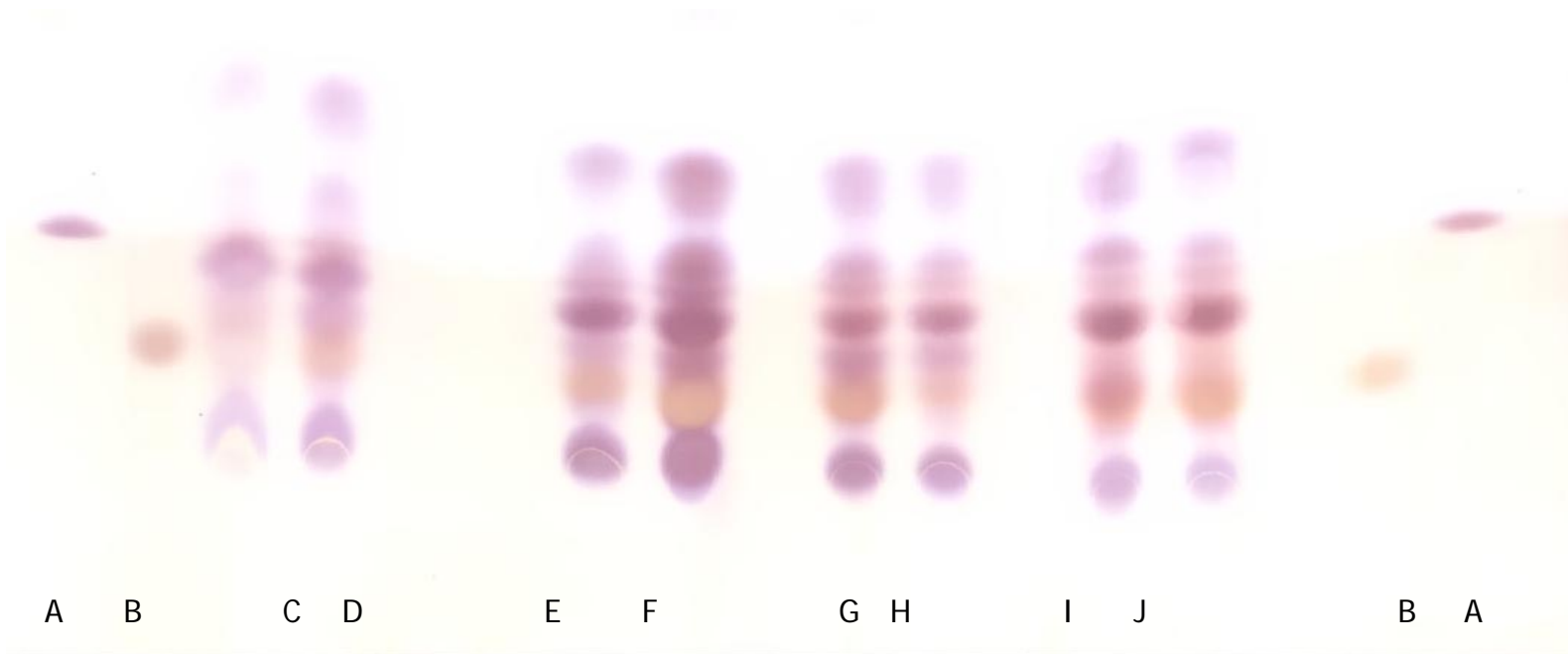


Figura 11. Análise de Histidina e Prolina em raízes de plântulas de *C. juncea* por T.L.C

- A) Padrão do Aminoácido Histidina
- B) Padrão do Aminoácido Prolina
- C) 0 mM 12 H
- D) 0,5 mM 12 H
- E) 0 mM 24 H
- F) 0,5 mM 24 H
- G) 0 mM 48 H
- H) 0,5 mM 48 H
- I) 0 mM 96 H
- J) 0,5 mM 96 H

Dando seqüência ao propósito de obter informações do efeito do Ni em *C. juncea*, foi realizado o estudo do comportamento de enzimas na presença do metal pesado Ni. Foram conduzidos ensaios bioquímicos para determinação das atividades da SOD, CAT e GR para parte aérea e para raízes de plântulas de crotalaria submetidas a diferentes concentrações de NiCl₂ (0 mM, 0,05 mM e 0,5 mM) nos períodos de 0 h, 12 h, 24 h, 48h, 72h e 96 h.

As CATs, são enzimas encontradas em todos organismos aeróbios, localizam-se no citoplasma e nas organelas mitocondrias e peroxissomos sendo responsáveis pela transformação de 2H₂O₂ em O₂e 2H₂O (Vranova et al., 2002).

Em plantas, a GSH é uma das principais defesas para células contra uma variedade de estresse oxidativos, incluindo poluição do ar, calor, frio e seca (Lea et al., 1998). A GSH regula a síntese de PCs e tem importante papel como antioxidante nos sistemas biológicos (Gallego et al., 1996). Entretanto, para a maioria destas funções, principalmente o papel antioxidante, a GSH deve estar na sua forma reduzida. Essa oxirredução é catalisada pela Glutathione Redutase (GR) (Creissen et al., 1994). Segundo este autor, esta enzima, catalisa a redução da Glutathione Oxidada (GSSG) para a Glutathione Reduzida (GSH) na presença da NADPH.

As SODs são enzimas responsáveis por catalisar a dismutação de O₂^{•-} a H₂O₂ e O₂, desta forma possuem um importante papel na célula contra efeitos tóxicos destes O₂^{•-} formados em diferentes compartimentos celulares (Del Rio et al., 2002).

Os resultados obtidos nestes estudos, indicaram que estas enzimas desenvolveram modificações de suas atividades bioquímicas na parte aérea e em raízes na presença do Ni. Em raízes foi observado alta atividade de SOD e baixa atividade de CAT e GR, entretanto na parte área foi observada baixa atividade de SOD e alta atividade de CAT e GR.

De forma semelhante, Ali et al. (2002) observaram em arroz tanto em raízes como na parte aérea alterações nas atividades das enzimas CAT, GR e SOD na presença de Hg.

Da mesma maneira o estresse provocado pelo frio em pepino causou a redução na atividade da SOD (Feng et al., 2003). Entretanto, a atividade da SOD foi estimulada em *Cajanus cajan* na presença do Zn (Rao & Sresty, 2000). Em ervilha o Cd induziu o aumento da atividade desta enzima (Dalurzo et al., 1997).

A atividade da SOD aumentou em folhas de aveia tratadas com Cu (Luna et al., 1994), em girassol a presença do Cd induziu o aumento da atividade da SOD (Gallego et al., 1996). Também foi verificado em ervilhas que o Selênio induziu o aumento da atividade desta enzima (Xue et al., 2000).

De acordo com Espen et al. (1997), o Ni exerce efeito tóxico na planta a partir de mecanismos específicos, com inativação e a degradação seletiva de proteínas, como as de membrana por exemplo. Segundo estes autores, este processo causaria a ruptura das mesmas, o que levaria a formação de EAOs. De forma semelhante, estudos realizados com Al em milho indicaram a rápida formação de EAOs após a aplicação deste metal nesta planta (Boscolo et al., 2003). Conseqüentemente, este aumento na formação de EAOs seria responsável por mudanças da atividade da SOD (Guo et al., 2004).

Neste trabalho, observou-se em plântulas de crotalaria, que ocorrem diferenças entre os níveis de atividade de SOD, entre os tratamentos com NiCl₂ em ambos tecidos testados. Conforme pode ser observado pelas Figuras 12 e 13.

No caso da *C. juncea* na parte aérea, quando comparado com as raízes, foi constatada a redução da atividade da SOD ao longo dos tratamentos com as duas concentrações de Ni utilizadas. De forma semelhante, em milho submetido ao estresse salino foi constatada baixa atividade da SOD na parte aérea (Menezes-Benavente et al., 2004).

Estes autores, sugerem que nestas condições de estresse deva estar ocorrendo uma rápida indução dos genes de síntese de enzimas, como a SOD, e ressaltam que mesma estaria sendo degradada rapidamente, devida a sua ação de remoção das EAOs por tanto, o nível verificado de atividade desta enzima é baixo.

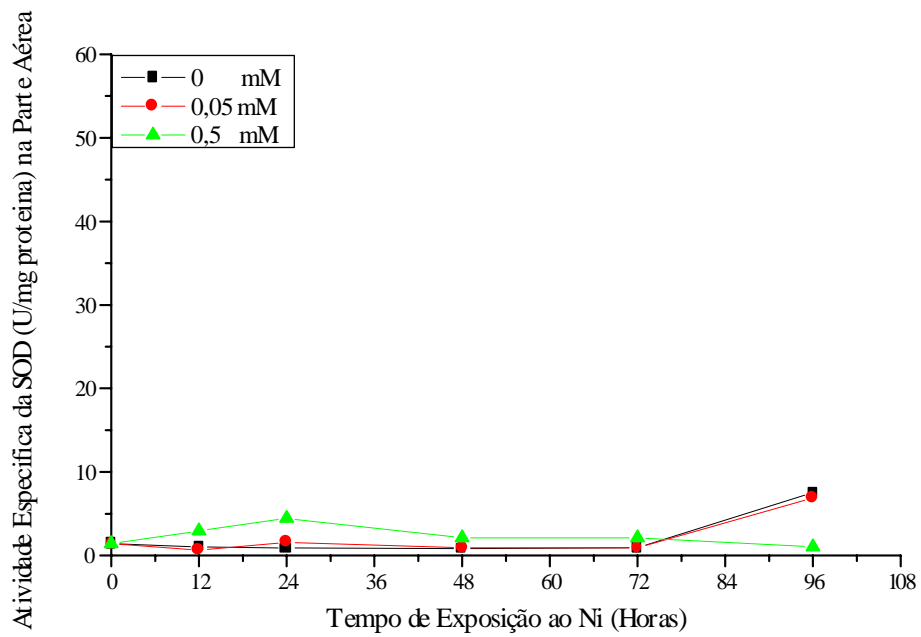


Figura 12. Atividade específica da SOD na parte aérea de plântulas de crotalaria submetidas à diferentes concentrações de Ni.

Em raízes a concentração de 0,05 mM de NiCl₂ mostrou a mesma tendência observada no tratamento controle, com elevada atividade da SOD até 72 h e com um posterior declínio. O que caracterizou um estágio de exaustão, que possivelmente superou a capacidade de adaptação desta enzima nestas plântulas. Entretanto, foi observado que a concentração 0,5 mM de NiCl₂, induziu um aumento da atividade desta enzima até 48 h, entretanto a partir deste horário houve modificação neste processo fisiológico (Figure 13).

Neste trabalho, observou-se que nas plantas de *C. juncea* ocorreram diferenças significativas entre os níveis de atividade da SOD entre raízes a parte aérea em relação aos tratamentos com Ni e seus respectivos controles. Além disso, a partir de 48 h, foram observadas variações específicas para esta enzima para ambos tecidos. Isso sugere que a partir deste horário, o estresse causado por este metal, no desenvolvimento da crotalaria, dentro das condições e concentrações utilizadas, induziu aumento da formação de EAOs (Figura 13).

Estes resultados são semelhante em *Alyssum bertolonii*, onde foi relatado o aumento da atividade da SOD em raízes que foram expostas ao Ni (Boominathan & Doran, 2002). Este autores interpretam este resultado, sugerindo que esta enzima nas raízes seja o mecanismo utilizado por esta planta, para reduzir possíveis danos provocados pelo Ni.

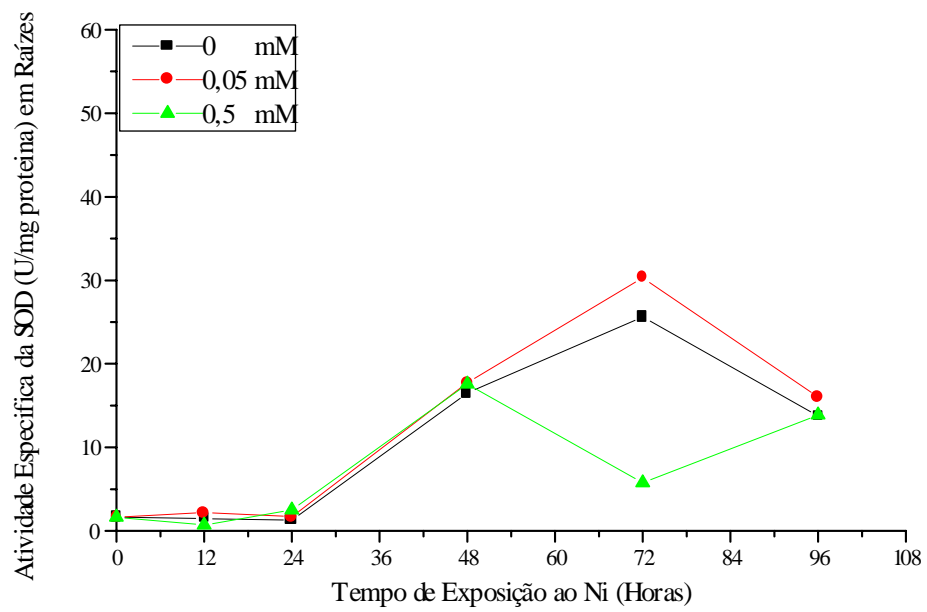


Figura 13. Atividade específica da SOD em raízes de plântulas de crotalaria submetidas à diferentes concentrações de Ni.

Os resultados apresentados da atividade de SOD para concentrações de géis confirmam os resultados obtidos no ensaio em espectrofotômetro.

Nas análises dos tratamentos realizados na concentração 0,05 mM de NiCl₂ foram observados as presenças de 2 isoformas de SOD em ambos tecidos ao longo do tratamento, apesar destas bandas não apresentarem uma boa definição, devido ao procedimento na revelação dos géis na luz (Figuras 14 e 15).

Nos tratamentos em que foi aplicadas a concentração 0,5 mM de NiCl₂ foram constatadas as presenças de até 3 isoformas na parte aérea desta plântulas de *C. juncea* (Figura 16). De forma semelhante, os estudos das raízes demonstraram 3 isoformas distintas de SOD e pode-se verificar que não ocorreram diferenças entre ativação ou inibição específica destas isoformas (I, II e III) em todos os tratamentos avaliados e em relação ao controle (Figura 17).

Estes resultados sugerem que neste trabalho, as variações específicas nas isoformas de SOD, tenham influência do estresse induzido pelo Ni. Este fato está de acordo com os apresentados para *C. juncea*. Apesar de ter sido utilizado o Cd, também foi apresentado alteração no padrão de isoenzimas nos tratamentos para este metal tanto em raízes quanto na parte aérea (Pereira et al., 2002). De forma semelhante, Khanna-Chopra & Babarinath (2004), estudaram atividade de SOD em resposta ao estresse induzido por altas temperaturas e constataram que a concentração isoenzimas em situação de estresse. Em tomate, após ter sido submetido a exposição de EAOs, foi observado a indução do mRNA que traduziu a Fe-SOD (Rejeb et al. 2004).

Portanto, esta condição de estresse induzido pelo Ni possivelmente levou a planta a apresentar alterações metabólicas, com a formação de isoenzimas que poderiam auxiliar

nesta condição desfavorável e diminuindo os efeitos estressantes nesta planta como pode ser constatado pelas Figuras 16 e 17.

Realmente, uma variedade de estresses oxidativos têm mostrado alterar a expressão dos genes que codificam as isoenzimas de SOD (Kaminaka et al., 1999).

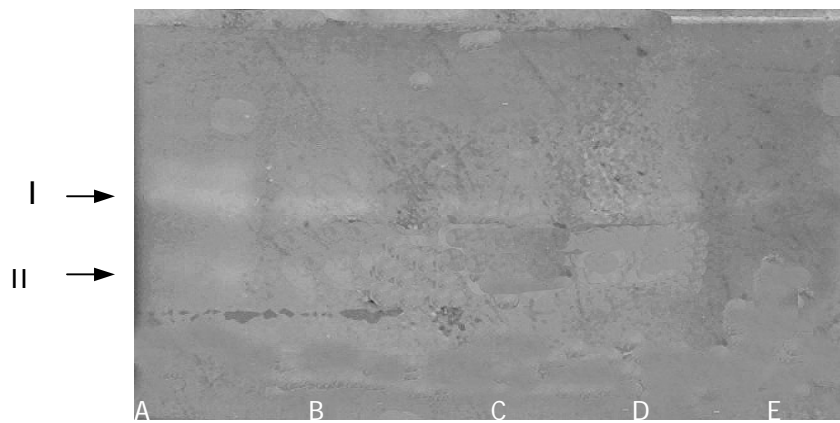


Figura 14. Atividade da SOD na parte aérea de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,05 mM de NiCl₂. A) Amostra Padrão de SOD, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24, E) 96 H. Os números a esquerda indicam isoformas de SOD.

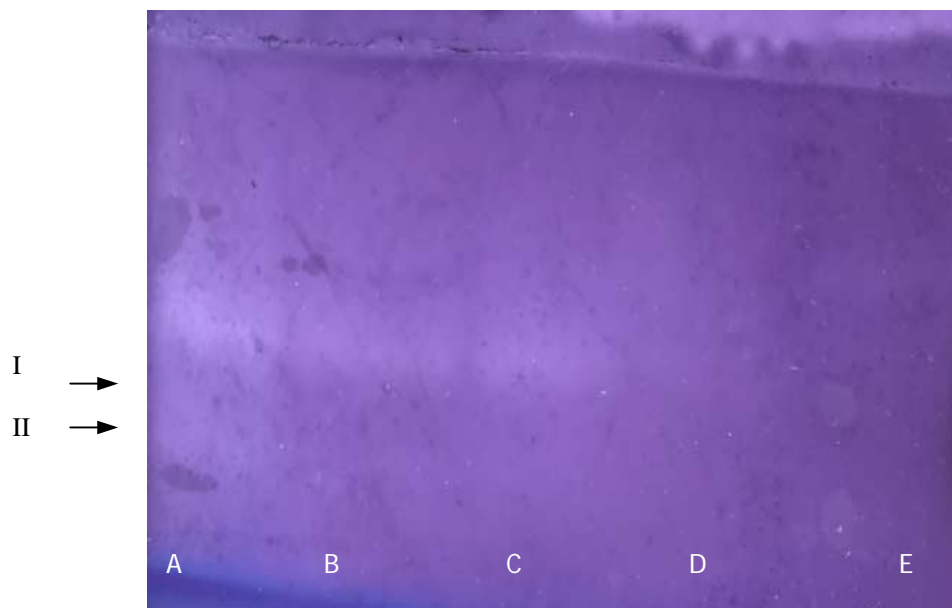


Figura 15. Atividade da SOD em raízes de plântulas de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,05 mM de NiCl_2 A) Amostra Padrão de SOD, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24 H, E) 96 H. Os números a indicam isoformas de SOD.

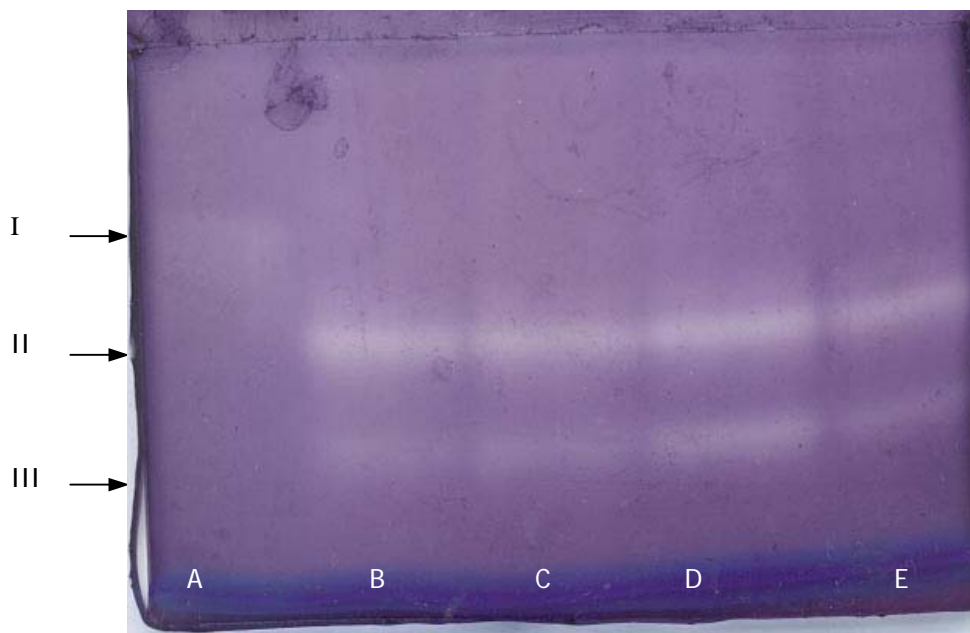


Figura 16. Atividade da SOD na parte aérea plântulas de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,5 mM de NiCl_2 . A) Amostra Padrão de SOD, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24 H, E) 96 H. Os números a indicam isoformas de SOD.

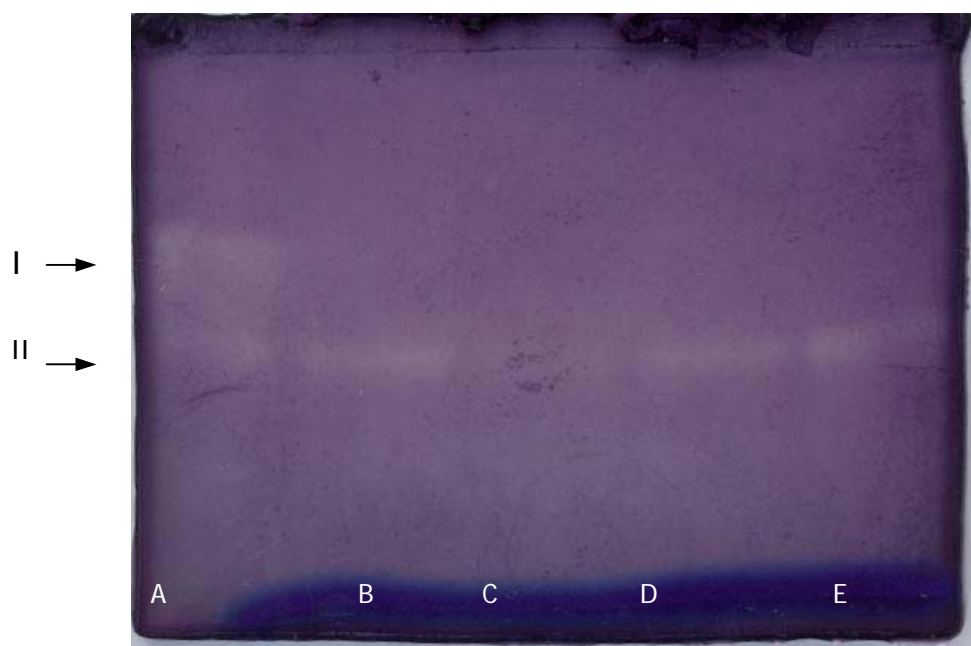


Figura 17. Atividade da SOD em raízes de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,5 mM de NiCl_2 . A) Amostra Padrão de SOD, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24 H, E) 96 H. Os números a esquerda indicam isoformas de SOD.

Em plantas, existem três isoformas da SOD que são classificadas a partir do íon metálico presente em seu sítio ativo Cobre-Zinco (Cu/Zn-SOD), Manganês (MnSOD) e Ferro (FeSOD) (Sherme & Dizengremel, 1998).

A Cu/Zn-SOD é a mais abundante entre as metaloenzimas sendo observada no citosol e em cloroplastos de células eucariontes e são sensíveis à concentrações milimolares de KCN (cianeto de potássio) e H₂O₂. A MnSOD é encontrada na matriz mitocondrial e em cloroplasto e apresenta insensibilidade ao KCN e H₂O₂ e a FeSOD, é encontrada no cloroplasto, peroxissomos e mitocôndrias sendo insensível ao KCN e irreversivelmente inativada pelo H₂O₂ (Alscher et al., 2002, Azevedo et al., 1998).

Em folhas de ervilhas verificou-se o aumento das variações de isoformas de SOD após a aplicação do herbicida paraquat (Donauhe et al., 1997). Em *Arabidopsis thaliana* submetidas à radiação UV-B, verificou-se a indução da formação da Cu/Zn-SOD (Rao et al., 1996). Enquanto que nos cloroplastos de *Nicotiana plumbaginifolia* o ozônio reduziu a formação de FeSOD (Masia, 1998).

No presente estudo também foram identificadas os tipos de isoformas que são induzidas nesta planta. Foi constatada a indução de isoenzimas na parte aérea, sendo duas isoformas caracterizadas como Cu/Zn-SOD (A), uma Fe/SOD (B) e duas como Mn/SOD (C) (Figura 18).

Diferentemente, nos estudos realizados com raízes em que foram observadas, as isoenzimas Cu/Zn-SOD (A) e Mn/SOD (C) (Figura 19).

Esta alteração de atividade das isoformas de SOD sugere que o Ni esteja envolvido na regulação da transcrição das mesmas. De fato, a alteração no padrão de atividade de SOD é bastante variada e muitas vezes depende da espécie de planta, tecido e etapas de desenvolvimento da espécie (Azevedo et al., 1998).

Resultados similares foram observados em *Mesembryanthemum crystallinum*. Após o estresse salino, foi constatado a indução de 3 isoformas Mn/SOD (Slesak & Miszalski, 2003). Em trigo submetido a baixas temperaturas, houve a indução de 3 isoenzimas, sendo 2 Fe/SOD e 1 Cu/Zn-SOD. Também em *Arabidopsis thaliana* quando foi estudado o efeito do estresse salino, verificou-se após a indução deste processo, uma superexpressão da Mn/SOD (Wang et al., 2004). Segundo estes autores, o aumento de atividade desta isoenzima foi suficiente para conferir proteção contra a toxicidade de EAOs. Em tomate submetido a altas temperaturas, observou-se a indução de Fe/SOD (Rivero et al., 2003).

Segundo Bower et al. (1994), as metaloenzimas de SOD apresentam em sua seqüência o aminoácido histidina. Aminoácido envolvido na complexação de Ni (Kramer et al., 1996).

Desta forma, o uso de técnicas moleculares e avaliação de seqüências de cDNA que codificam as diferentes isoformas das SOD possibilitam expandir consideravelmente a compreensão do papel desenvolvido por esta enzima e o estresse oxidativo em plantas (Bowler et al., 1994).

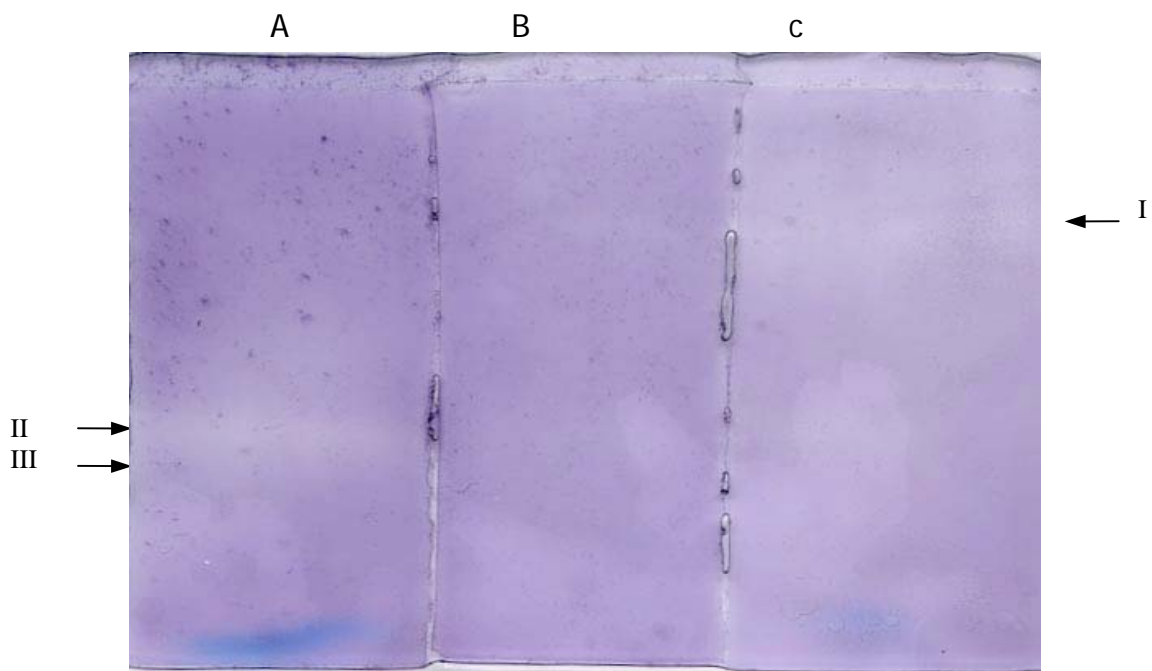


Figura 18. Isoformas de SOD em raízes de plântulas de *C. juncea*. A) Controle, B) Incubação em KCN antes da revelação, C) Incubação em H₂O₂ antes da revelação. Os números indicam as isoformas da SOD

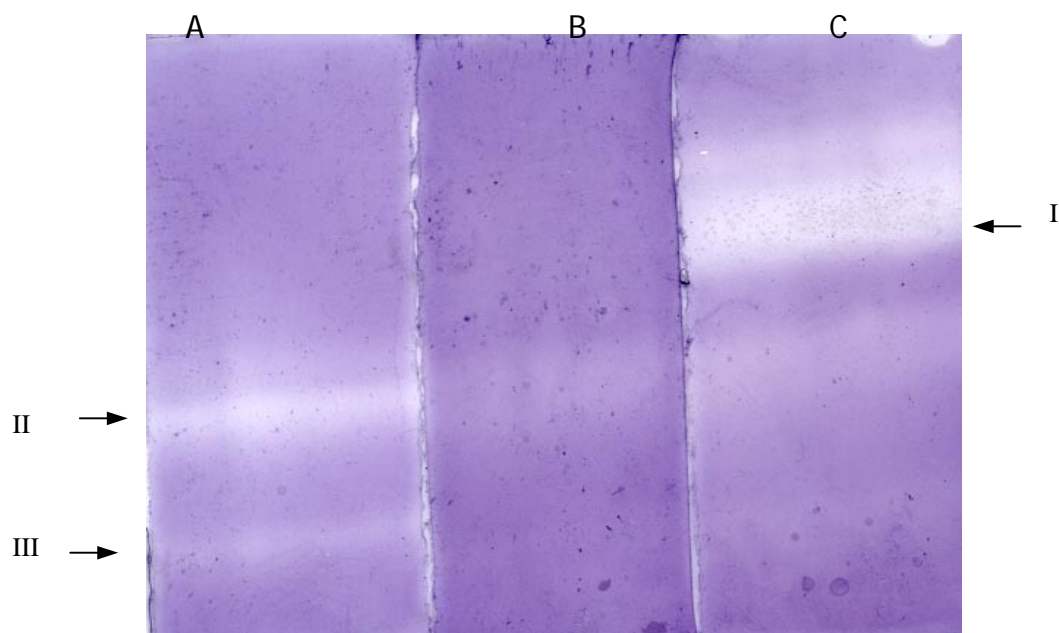


Figura 19. Isoformas de SOD na parte aérea de plântulas de *C. juncea*. A) Controle, B) Incubação em KCN antes da revelação, C) Incubação em H₂O₂ antes da revelação. Os números indicam as isoformas da SOD.

Dando continuidade a estes estudos, foi feita a quantificação de proteínas totais dos extratos de raízes e da parte aérea de plântulas de crotalaria, que receberam as doses 0,05 mM e 0,5 mM de NiCl₂. Com este propósito foi utilizada o método de géis para atividade de proteínas totais em SDS-PAGE nos períodos de 0 h ,12 h, 24 h e 96 h.

Os resultados mostraram que na parte aérea houve alteração na formação de bandas em diferentes concentrações deste metal, no decorrer do tempo, como pode ser observado na Figura 20, comparando as isoformas IV e VI do controle com as outras bandas.

Também nas raízes foram constatadas variações que envolvem alterações na intensidade das bandas específicas, bem como a presença ou ausência das mesmas em algumas bandas. A alteração da quantidade de bandas das proteínas nas raízes, sugere estar relacionada ao fato da presença de Ni estar inibindo o suprimento de carboidratos da parte aérea para raízes (Figura 21, Banda D).

Neste caso, a planta possivelmente estaria utilizando como estratégia, as proteínas como substrato no processo respiratório. Estes resultados obtidos corroboram com os relatos de outros autores como Kastori et al. (1992), que verificaram a redução da quantidade de proteínas em girassol após a aplicação de metais pesados. Estes autores concluíram que estes metais estariam afetando este processo metabólico desta planta. No trigo, o Cd provocou alteração em eventos fisiológicos, como a fotossíntese e foi constatada a disponibilidade de proteínas para garantir uma maior tolerância ao estresse nesta planta (Shukla et al., 2003). Em *Lemna minor*, após a aplicação de Pb também foi observada a redução da concentração de proteínas (Mohan & Hosetti, 1997), da mesma maneira, em experimentos com raízes de milho submetidas ao Ni, essas plantas apresentaram variações significativas na fisiologia de suas proteínas em resposta ao estresse por este metal,

passando as mesmas exercer o papel de fonte de energia para as raízes na ausência de carboidratos (Dieuaide et al., 1999).

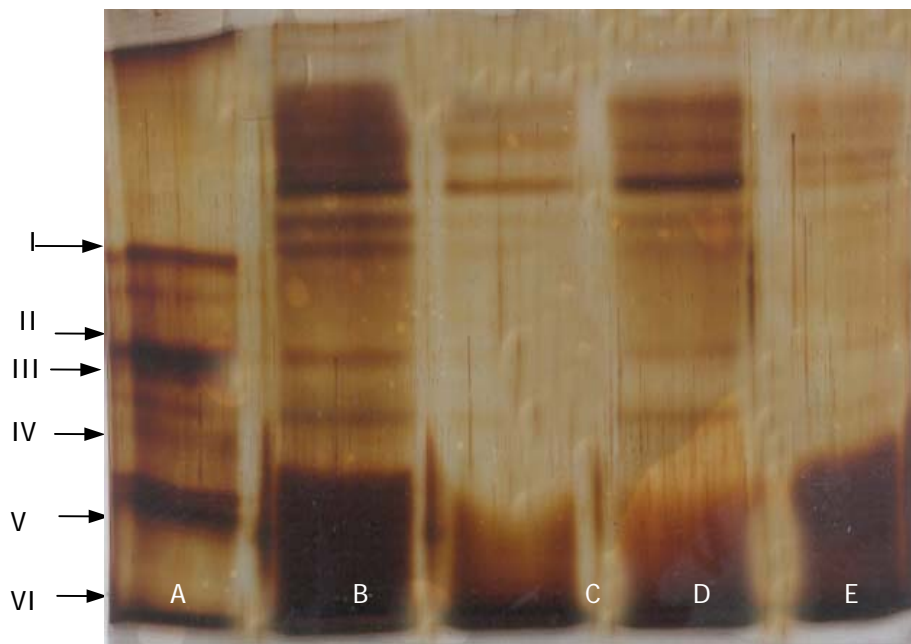


Figura 20. Eletroforese em gel de Proteína Total (coloração com prata) com 5 μ L de extrato da parte aérea de plântulas de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,5 mM de NiCl_2 . A) Amostra Padrão de Proteína, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24 H, E) 96 H. Os números indicam peso molecular de proteína total.

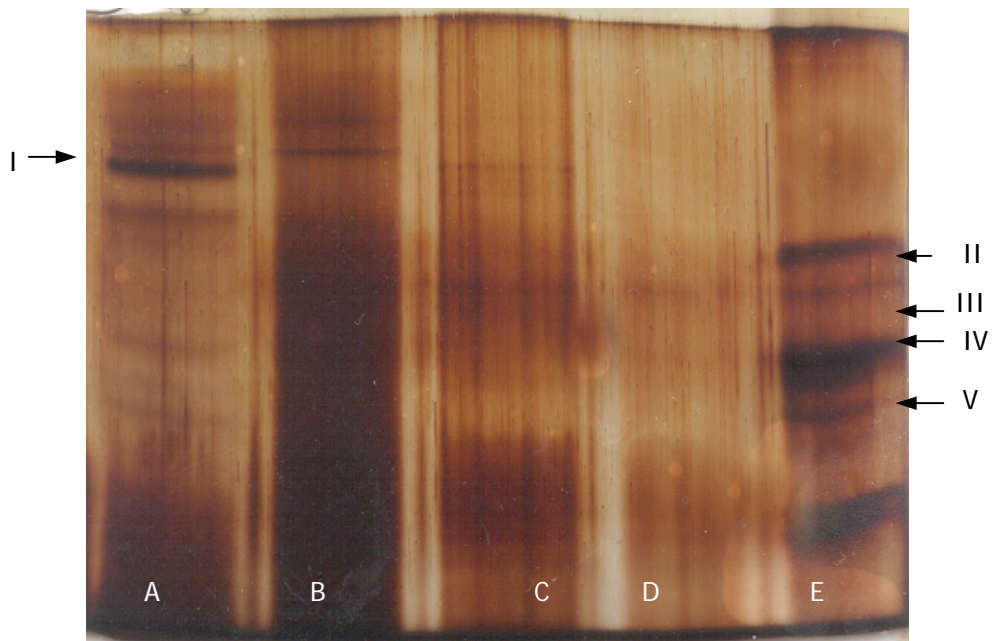


Figura 21. Eletroforese em gel de Proteína Total (coloração com prata) com 5 μ L de extrato vegetal de raízes de plântulas de *C.juncea*, submetidas à concentração 0,5 mM de NiCl_2 . A) Amostra Padrão de Proteína, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24 H, E) 96 H. Os números indicam peso molecular de proteína total.

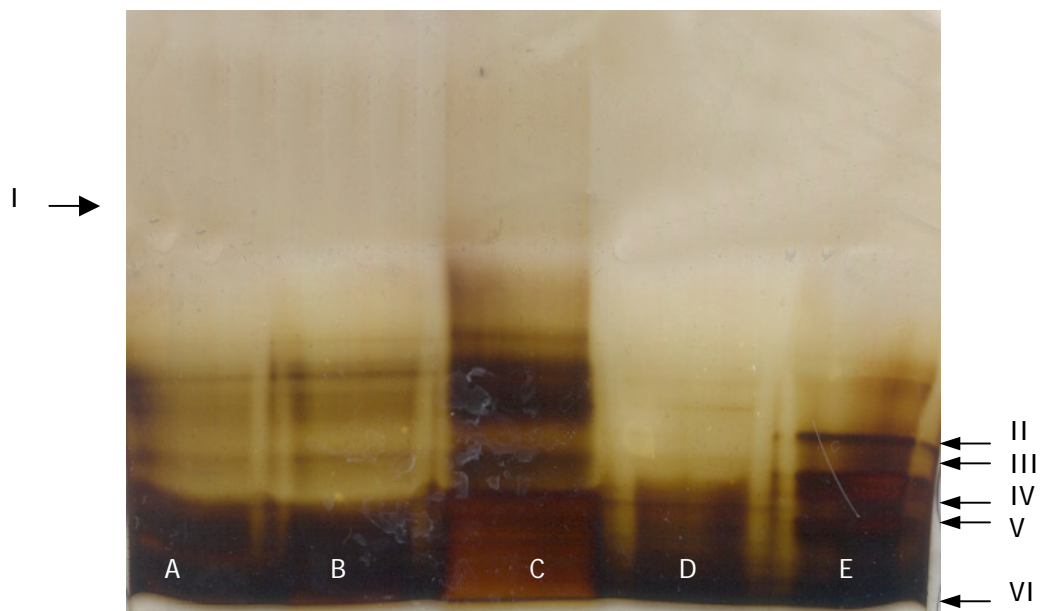


Figura 22. Eletroforese em gel de Proteína Total (coloração com prata) 5 μ L de extrato vegetal da parte aérea de plântulas de *C. juncea*, submetidas à concentração 0,05 mM de NiCl_2 . A) Amostra Padrão de Proteína, B) 0 H (Controle), C) 12 H, D) 24, E) 96 H. Os números indicam peso molecular de proteína total.

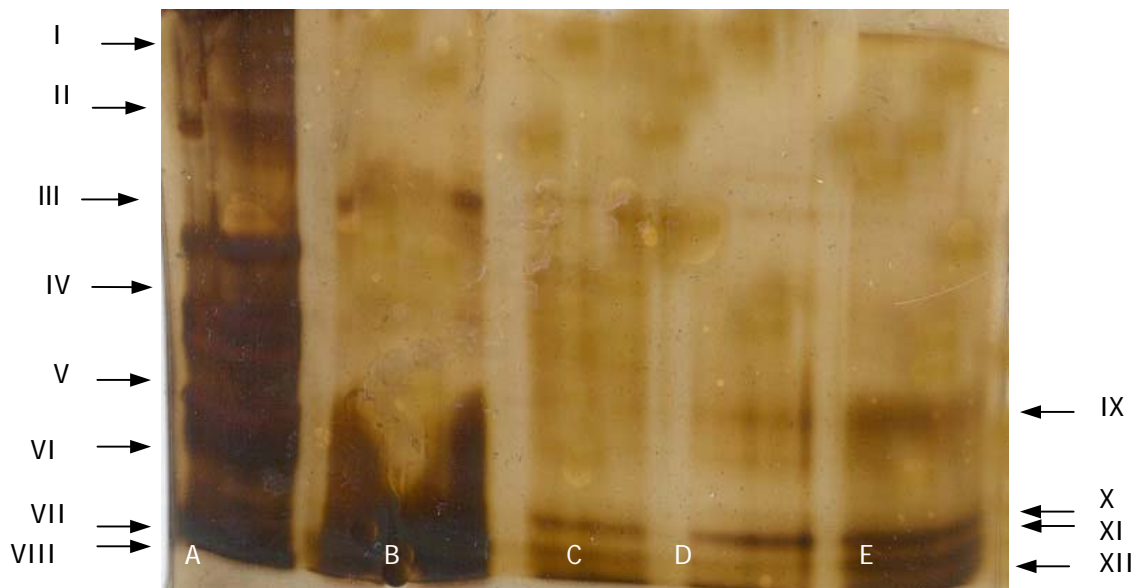


Figura 23. Eletroforese em gel de Proteína Total (coloração com prata) 5 μ L de extrato vegetal de raízes de plântulas de *C.juncea*, submetidas à concentração 0,05mM de NiCl₂. A) Amostra Padrão de Proteína, B) 0 Horas (Controle), C) 12Horas, D) 24, E) 96 Horas. Os números indicam peso molecular de proteína total.

Van Assche & Clijsters (1990) relatam que a exposição a metais pesados, como Cd e Ni induz alterações tanto nas atividades qualitativas como quantitativas das enzimas presentes em plantas.

Neste trabalho, alterações de comportamento da atividade das enzimas foram observadas tanto em raízes como na parte aérea destas plântulas após a aplicação de Ni. Isso indica que com resposta induzida nestas condições de estresse, as enzimas podem ter restringindo suas atividades ao tecido da planta afetado por este metal.

De fato, Schickler & Caspi (1999) constataram que o sistema antioxidante tem importante papel no mecanismo de tolerância das plantas à exposição ao Ni, impedindo a formação EAOs ou a remoção das mesmas.

6-CONCLUSÕES

1-Em raízes e na parte aérea de plântulas de *C. juncea*, as atividades observadas para as enzimas CAT e GR, tanto para dosagem como para tempo de tratamento observou-se padrões semelhantes de resposta ao Ni, verificando-se a elevação da atividade destas enzimas na parte aérea.

2-Alta atividade observada da CAT na parte aérea pode estar relacionada com a formação de EAOs nesta região no processo de fotorrespiração. O aumento na atividade da GR na parte aérea pode ser explicado pelo fato de ser o ciclo Halliwell-Asada, o principal mecanismo que age na desintoxicação das EAOs geradas pelo Ni. Cabendo a GR manter altos os níveis de GSH e AsA.

3- Em relação a atividade da SOD, na parte aérea, houve tendência a atividade desta enzima se manter baixa neste órgão. Entretanto nas raízes, verificou-se elevação da atividade mediante a exposição ao Ni, o que sugere que esta enzima possa conferir tolerância ao metal pesado.

4- No caso da quantificação de aminoácidos totais, mediante a exposição ao Ni, constatou-se que este genótipo não acumula aminoácidos livres totais nos tratamentos como forma de superar o efeito do Ni.

5- Indiretamente, o Ni afeta a absorção de nutrientes, em *C. juncea* como o Fe e Zn.

6- As plantas de *C. juncea*, submetidas a altas doses de Ni, acumulam este elemento, principalmente nas raízes, entretanto, existe uma relação entre os teores de Ni na parte aérea e o aumento de peroxidação lipídica nesta região, conforme o estudo de MDA permitiu constatar.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, B.M.; CHUN, H.S.; LEE, C.B. Response of antioxidante enzymes in rice (*Oryza sativa*) under mercury stress. **Journal of Plant Biology**, v.45, p.141-147, 2002.

ALLEN, R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using trangenic plants. **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1049-1054, 1996.

AN, YJ.; KIM, Y.M.; Kwon, T. I.; JEONG, S. W. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and biocccumulation. **Science of the Total Environment**, v.326, n.1-3, p.85-93, 2004.

ATTA-ALY, M.A. Effect of nickel addition on the yield and quality of parsley leaves. **Scientia Horticulturae**, v.82, p.9-24, 1999.

ABOU, A.M.M.; SYMEONIDIS, L.; HATZISTAVROU, E.; YUPSANIS, T. Nucleolutive activities and appearance of a new DNase in relation to nickel and manganese accumulation in *Alyssum murale*. **Journal of Plant Physiology**, v.159, n.10, p.1087-1095, 2003.

ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1049-1054, 1995.

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.
- AZEVEDO, R.A.; DAMERVAL, C.; LANDRY, J.; LEA, P.J.; BELLATO, C.M.; MEINHARDT, L.W.; LE GUILLOUX, M.; DELHAYE, S.; TORO, A.A.; GAZIOLA, S. A.; BERDEJO, B.D.A. Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and flourey Mutations. **European Journal of Biochemistry**, v.270,p.4898-4908, 2003.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R.M.; SMITH, R. J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.280-292, 1998.
- AZZINI, A.; SALGADO, A.L.B.; TEIXEIRA, J.P.F. Curva de Maturação de *Crotalaria juncea* L. **Brangatia**, v.40, p.1-10, 1981.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL-FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage in *Zea mays* shoots. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, n.7, p.1085-1097, 2001.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, E.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology**, v.36, n.9, p.689-694, 1998.

- BAEK, K.H.; SKINNER, D.Z. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. **Plant Science**, v.165, n.6, p.1221-1227, 2003.
- BEUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase-Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276, 1971.
- BEYER, W. F.; FRIDOVICH I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Analytical Biochemistry**, v.161, p.559-566, 1987.
- BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum**, v.40, n.1, p.131-135, 1997/98.
- BIELESKY, R.L., TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude extract by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, n.2, p.278-293, 1986.
- BOOMINATHAN, R.; DORAN, P.M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. **New Phytologist**, v.156, p.205-215, 2002.
- BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v.62, n.2, p.181-189, 2003.

- BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, n.3, p.199-218, 1994.
- BOYD, R.S.; JAFFRE, T.; ODOM, J.W. Variation in nickel content in the nickel-hyperaccumulating shrub *Psychotri couarrei* (*Rubiacea*) from New Caledonia. **Biotropica**, v.31, n.3, p.403-410, 1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-259, 1976.
- BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus De L Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences**, v.322, p.43-54, 1999.
- BRKIC, I.; SIMIC, D.; ZDUNIC, Z.; JAMBROVIC, A.; LEDENCAN, T.; KOVACEVIC, V.; KADAR. Genotypic Variability Of Micronutrient Element Concentration In Maize Kernel. **Cereal Research Communications**, v.32, n.1,p.107-112, 2004.
- CHEN, C.T.C.; CHEN, L.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. **Plant Science**, v.160, p.283-290, 2000.

CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v.23, n.5, p.408-413, 1996.

CHUNILALL, V.; KINDNESS, A; JONNALAGADDA, S. B. Heavy Metal uptake by Spinach leaves grown on contaminated soils with lead, mercury, cadmium, and nickel. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food contaminants and Agricultural Wastes**, v.39, n.3, p.473-481, 2004.

CLARKSON, D.T.; LÜTTGE, U. Divalent cations, transport and compartmentation. **Progression of Botany**, v. 51, p. 93-112, 1989.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. *In*: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. **CRC Press: Boca Raton**, Florida, 1994. p.343-364.

CUI, Y.S.; WANG, Q.R.; DONG, Y.T.; LI, H.F. Elemental sulfur effects on Pb and Zn uptake by *Indian mustard* and winter wheat. **Journal of Environmental Sciences-China**, v.15, n.6, p.836-840, 2003.

DALURZO, H.C.; SCANDALIO, L.M.; GOMEZ, M.; DEL RIO, L.A. Cadmium infiltration of detached pea leaves and effect on its activated oxygen metabolism. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v.37, n.3, p 59-64, 1997.

- DAVIS, D.G.; SWANSON, H.R. Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L). **Environmental and Experimental Botany**, n.46, p.95-108, 2001.
- DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1255-1272, 2002.
- DIEAUAIDE, M.; BROUQUISSE, R.; PRADET, A.; RAYMOND, P. Increased β -fatty acid-oxidation after glucose starvation in maize root tips. **Plant Physiology**, v.99, p.595-600, 1992.
- DONAHUE, J.L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C.L.; GRABAU, E.A.; ALSCHER, R.G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. **Plant Physiology**, v.113, p.249-257, 1997.
- EDWARDS, E.A.; ENARD, C.; CRESSEIN, G.P.; MULLINEAUX, P.M. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. **Planta**, n.192, p.137-143, 1994.
- EL-SHINTINAWY, F.; EL-ANSARY. Differential effect of Cd^{+2} and Ni^{+2} on amino acid metabolis in soybean ssedlings. **Biologia Plantarum**, v.43, n.1, p.79-84, 2000.
- EL-SHINTINAWY, F. Glutathione counteracts the inhibitory effect induced by cadmiun on Photosynthetic process in soybean. **Photosynthetica**, v.36, n.1/2, p.171-179, 1999.

ESPEN, L.; PIVORANO, L.; COCUCCI, S.M. Effects of Ni⁺² during the early phases of radish (*Raphanus sativus*) seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v.38, p. 187-197, 1997.

FADZILLAH, N. M.; GILL, V.; FINCH, R. P.; R.H. Chilling oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, v.199, p.552-556, 1996.

FENG, Z.Z.; GUO, A.H.; FENGI, Z.W. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.39, n. 3, p. 277-283, 2003.

FOYER, C.H.; DE, PAEPE, R.; NOCTO, R G. Modulation of plant development and defence by redox state and antioxidants: the roles of leaf mitochondria and ascorbate content. **Free Radical Research**. v.37, p.1-1 Suppl. 2, 2003.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Oxidative damage caused by cadmium choride in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, v.58, n.1/2, p.41-52, 1996.

GAWEL, J.E.; TRICK, C.G.; MOREI, F. M.M. Phytochelantis are biondicators of metal exposure via direct foliar uptake in tress near Sudbury, Ontario Canada. **Environmental Science & Technology**, v 35, n.10, p2108-2113, 2001.

GERENDAS, J.; ZHU, Z.; SATTELMACHER, B. Influence of N and Ni supply on nitrogen metabolism and urease activity in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.326, p.1545-1554, 1999a.

GERENDAS, J., POLACCO, J. C., FREYERMUTH, S. K., SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition of Soil Science**, v.162, p.241-256, 1999b.

GOMES, L. H. Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Dissertação (M.S.). 88 p, 1995.

GONZALES, H.; RAMIREZ, M.; TORRES, I. Impact of nickel mining and metallurgical action on the distribution of heavy metals in sediments of Levisda, Cabonico and Nipes Bays, CUBA. **Environmental Geochemistry and Health**, v.19, n.52, p.57-62, 1997.

GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.L.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.1, p.131-136, 2005.

GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. Phytochelatin—the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v.230, n.4726, p.674-676, 1985.

GUO, Y.T.; ZHANG, G.; ZHOU, M.; WU, F.; CHEN, J. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, v.258, n.1, p.241-248, 2004.

GUPTA, A.S.; HEINEN, J.L.; HOLADAY, A.S.; BURKE, J.J.; ALLEN, R.D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Plant**, v.90, p.1629-1633, 1993.

HAWRYLAK, B.; SZYMANSKA, M. Selenium as a sulphhydrylic group inducer in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.9, n.2, p.329-336, 2004.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast in Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.25, p.2141-2145, 1968.

HELSPER, J.P. F.G.; VOS, C.H.R.; JONKER, H.H.; VAN DEN BROECK, H.C.; JORDI, W.; POT, C.S.; KEIZER, L.C.P.; SCHAPENDONK, A.H.C, M. Response of selected antioxidants and pigments in tissues of *Rosa hybrida* and *Fuchsia hybrida* to supplemental UV-A exposure. **Physiologia Plantarum**, v.117, n. 2, p.171-178, 2003.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, I. The water culture method for growing plant without soil. **Berkeley: University of California Agricultural Experiment Station Bulletin**, 1951. 347p.

HOWDEN, R.; ANDERSEN, C.R.; GOLDSBROUGH, P.B.; COBBETT, C.S. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis-thaliana*. **Plant Physiology**,v.107, n.4, p.1067-1073, 1995.

HUILLIER, L.; AUZAC, J.; DURAND, M.; FERRÉRE, N.M. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivares: growth, structure, Ni concentration, and localization. **Canadian Journal Botanic**, v. 74, p.1574-1554, 1996.

JIANG, X.J.; LUO, Y.M.; LIU, S.L.; ZHAO, Q.G. Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by *Indian mustarde*. *Environmental geochemistry and health*, v.26, n.2, p.319-324, 2004.

KAMINAKA, H.; MORITA, M.; TOKUMOTO, T.; MASUMURA, K. Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stress. **Free Radical Research**, v.31, p.219-225, 1999.

KASTORI, R.;PETROVIC, M.;PETROVIC, N. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. **Journal of Plant Nutrition**, v. 15, n.11, p.2427-2439, 1992.

KELTEJENS, W. G.; VAN BEUSICHEM, M. L. Phytochelatins as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L) and wheat (*Triticum aestivum* L) Combined effects of copper and cadmium. **Plant and Soil**, v.203, n.1, p.119-126, 1998.

KHANNA-CHOPRA, R.; SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.320, n.4, p.1187-1192, 2004.

KINTZION, S.; BARBERAKI, M.; DROSSOPOULOS, J.; TURGELIS, P.; KONSTA, J. Effect of medium composition iron and explant source on the distribution profiles select micronutrients in mistletoes tissue. **Journal of Plant Nutrition**, v.26, n.2, p.369-397, 2003.

KOCSY, G.; TÓTH, B.; BERZY, T.; SZALAI, G.; JEDNÁKOVITS, A.; GALIBA, G. Glutathione Reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX-156 in maize and soybean. **Plant Science**, v.160, p.943-950, 2000.

KORICHEVA, J.; ROY, S.; VRANJIC, J.A.; HAUKIOJA, E.; HUGHES, P.R.; HANNIEN, O. Antioxidant Responses to stimulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. **Environmental Pollution**, v.95, n.2, p.249-258, 1997.

KRAMER, U.; HOWELLS, J. D. C.; CHARNOCK, J. M.; BAKER, A. J. M.; SMITH, J. C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, v.379, 1996.

KUKKOLA, E.; RAUTIO, P.; HUTTUNEN, S. Stress indications in copper and nickel-exposed Scots pine seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.43, p.197-210, 2000.

KUMAR , R. G.; DUBEY, R.S. Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings; Effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. **Journal of Plant Physiology**, v.155, n.1, p.118-121, 1999.

LAAKSO, K.; KINNUNEN, H.; HUTTUNEN, S. The glutathione status of mature Scots pines during the third season of UV-B radiation exposure. **Environmental Pollution**, v. 111, n.2, p.349 - 359, 2001.

LALL, N.; NIKOLOVA, R.V.; BOSA,A. Changes in isozyme patterns of superóxide dismutase, peróxide and catalase in leaves of *Impatiens flanaganiae* in response to Fe, Mn, Zn, and Cu deficiencies. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, v.63, n.1/2, p.147-153, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARBI, A.; MORALES, F.; ABADI, A.; GOGORCENA, Y.; LUCENA, J.J.; ABADIA, J. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: Induced Fe deficiency and growth inhibition. **Functional Plant Biology**, v.29, n.12, p.1453-1464, 2002.

LEA, P.J.; WELLBURN, F.A.M.; WELLBURN, A.R.; CREISSEN, G.P.; MULLINEAUX, P. M. Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. *In*: DE KOK, L. J.; STULEN, I. (Ed.) **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. p.241-250.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, A.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2º edição, São Paulo: Editora Savier, 2000. p.521-522.

LEOPOLD, I.; GÜNTHER, D.; SCHMIDT, J.; NEUMANN, D. Phytochelatins and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, v.50, p.1323-1328, 1999.

LESKO, K.; STEFANOVITS, E.; PAIS, I.; SIMON, L. Effect of cadmium and titanium-ascorbate stress on biologically active compounds in wheat seedling. **Novenytermeles**, v.50, n.1, p.71-81, 2001.

LOZANO-RODRIGUEZ, E.; HERNÁNDEZ, L.E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.306, p.123-128, 1997.

LUNA, C. M.; GONZALEZ, C.A.; TRIPPI, V.S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, p11-15, 1994.

MALAN, H.L.; FARRANT, J.M. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on soybean seed development. **Seed Science Research**, v.8, p.445-453, 1998.

MALLICK, N.; MONH, F.H. Reactive oxygen species; response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.183-193, 2000.

MASIA, A. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.668-672, 1998.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. Comportamento de cobre, Cd, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba, 1994. 197p. Tese (Livre-Docência)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MENEZES-BENAVENTE, L.; KERNODLE, S.P.; PINHEIRO-MARGIS, M.; SCANDALIOS, J. G. Salt-induced antioxidant metabolism defenses in maize (*Zea mays* L) seedlings. **Redox Report**, v.9. n.1, 2004.

MEYER, M., McLENDON, T.; FLECKENSTEINS, J.; SCHUNUG, E. Uptake of munitions-derived deplet uranium by three grass species. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.8, p.1415-1429, 2004.

MOHAN, B.S.; HOSETTI, B.B. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. **Environmental Pollution**, v.98, n.2, p.233-238, 1997.

NASCIMENTO, F.V (1999) Técnicas Analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispensação de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 32p.

OLIVEIRA, A.L.P.C. Evolução Cariotípica no Gênero *Crotalaria* L (Leguminosae). Piracicaba, 1992. 113p. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ÖNCEL, I.; KELES, Y.; ÜSTÜN. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in what seedlings. **Environmental Pollution**, v.107, p.315-320, 2000.

OVEN, M.; GRIIL, E.; GOLA, G.A.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Increase of free cystein and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. **Phytochemistry**, v.60, n.5, p.467-474, 2002.

PALACIOS, G.; MATAIX, J. The influence of organic amendment and nickel pollution on tomato fruit yield and quality. **Journal of Environmental Science and Health part B-pesticides food contaminants and Agricultural Wastes**, v.34, p.133-150, 1999.

PAN, S.; YAU, Y. The isozymes of superoxide dismutase in rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.32, p.253-258, 1991.

PANDA, R.; SAHU, S.K. Effects of zinc on the biochemical and production parameters of rice plant (*Oryza sativa*). **Cytobios**, v.98, n.388, p.105-112, 1999.

- PANDOLFIN, T.; GABBRIELLI, R.; CISCATO, N. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, v.19, n.12, p.1611-1627, 1996.
- PARIDA, B.K.; CHHIBBA, I.M.; NAYYAR, V.K. Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. **Scientia Horticulturae**, v.98, n.2, p.113-1119, 2003.
- PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, v.239, p.123-132, 2002.
- POULIK, Z. The danger of accumulation of nickel in cereals on contaminated soil. **Agriculture Ecosystems & Environmental**, v.63, n.1, p.25-29, 1997.
- PATRA, J.; PANDA, B.B. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. **Environmental Pollution**, n.101, p.99-105, 1998.
- RAO, K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stress. **Plant Science**, v.157, p.113-28, 2000.

RAO, K. M. V.; PALIYATH, G.; ORMROD, D. P. . Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.110, p.125-136, 1996.

REJEB, B.; LENNE, C.;LEBLANC, N.;JULIEN, JL.;AMMAR, S.; BOUZID, S.; AYADI, A. Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. **Comptes Rendus Biologies**, v.327, n.7, p.679-686, 2004.

RIVERO, R.M.; SANCHES, E.; RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Influence of temperature on biomass, iron, metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n.9, p.1065-1071, 2003.

ROSSI, G.; FIGLIOLIA, A.; SOCCIARELLI, S. Zinc and copper biaccumulation in *Brassica napus* at flowering and maturation. **Engineering in life Sciences**, v.4, n.3, p.271-275, 2004.

ROUT, G.R.; SAMANTARY, P. Chromium, nickel and zinc tolerance in *Leucaena leucocephala* (K8). **Silvae Genetica**, v.48, n.3, p.151-157, 1999.

ROY, S.B.; Bera, A.K. Individual and combined effect of mercury and manganese on phenol and proline content in leaf and stem of mungbean seedlings. **Journal of environmental Biology**, v.23, n.4, p.433-435, 2002.

SAMANTARY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Chromium and nickel tolerance of *Trema orientalis* (Blume) L. in tissue culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.21, n.1, p.27-35, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyper accumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.1, p.39-44, 1999.

SHERME, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.53, n.5/6, p.545-551, 1998.

SHAH, KAVITA.; KUMAR, RITAMBHARA, R.G.; DUBEY, R. S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, v.161, n. 6, p. 1135-1144, 2001.

SHINTINAWY, EL.; ANSARY, A. Diferencial effect of Cd⁺² and Ni⁺² on amino acid metabolism in soybean seedlings. **Biologia Plantarum**, v.43, n.1, 2000.

SHUKLA, U.C.; SINGH, J.; JOSHI, P.C.; KAKKAR. Effect of bioaccumulation of cadmium on biomass productivity, essential trace elements, chlorophyll, biosynthesis, and

macromolecules of what seedling. **Biological trace Element Research**, v.92, n.3, p.257-273, 2003.

SLESAK, I.; MISZALSKI, Z. Superoxide dismutase-like protein from roots of the intermediate C-3-CAM plant *Mesembrythemum crystallinum* L. in vitro culture. **Plant Science**, v.164, n.4, p.497-505, 2003.

SIMON, T.; EBERHARD, A.; ROHR, R. Effect of Ni on radish tuber cultivated on artificially soils. **European Journal of Soil Biology**, v.36, n.2, p.73-80, 2000.

SINGHAL, R.K.; ANDERSON, M.E.; MEISTER, A. Glutathione, a first line of defence against cadmium toxicity. **FASEB Journal**, v.1, p.220-223, 1987.

SOLOMOS, G. **Química Orgânica**, 2º edição, Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 2000. p.981-987.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M. Toxicity of trace elements in tobacco smoke. **Inhalation Toxicology**, V.9, n.9, p.867-890, 1997.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L) under NaCl salinity. **Plant Science**, n.161, p.613-619, 2001.

TARHANEN, S.; METSARINNE, S.; HOLOPAINEN, T.; OKSANEN. Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscencens* to wet deposited heavy metals and acid rain. **Environmental Pollution**, v.104, p.121-129, 1999.

TRIPATHI, A.K.; TRIPATHI, S. Changes in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bio-indicators of heavy metal toxicity. **Journal of Environmental Biology**, v.20, n.2, p.93-98, 1999.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cells and Environment**, v.13, p. 195-206, 1990.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VARGA, A.; MARTINEZ., R.M.G.; ZARAY, G.; FODOR, F. Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport process in cucumber plants by TXRF spectrometry. **Spectrochimica Acta Part-B Atomic Spectroscopy**, v.54,n.10, p-1455-1462, 1999.

VOGELI-LANGE, R.; WAGNER, G.J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.92, p.1086-1093, 1990.

- VRANOVA, E.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of experimental Botany**, v.53, n.372, p.1227-1236, 2002.
- WANG, Y. H.; YING, Y.; CHEN, J.; WANG, X. C. Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt tolerance. **Plant Science**, v.167., n. 4, p.671-677, 2004.
- WENG, L.P.; LEXMOND, T.M.; WOLTHOORN, A.; TEMMINGHOFF, E.J.M.; VAN RIEMSDIJK, W. H. Phytotoxicity and bioavailability of nickel. **Environmental Toxicology and Chemistry** v.22, n.9, p.2180-2187, 2003.
- WHEAL, M. S.; RENGEL, Z.; GRAHAM, R. D. Chlorsulfuron reduces extension of wheat root tips in low-zinc solution culture. **Annals of Botany**, v.81, n.3, p.385-389, 1998.
- WHEELER, C.T.; HUGHES, L.T.; OLDROYD, J.; PULFORD, I.D. Effects of nickel on Frankia and its symbiosis with *Alnus glutinosa* (L.) Gaerth. **Plant and Soil**, v.231, n.81-90, 2001.
- XIANG, C.B.; OLIVER, D.J. Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy metals and Jasmonic Acid in Arabidopsis. **Plant Cell**, v.10, n.9, p.1539-1550, 1998.
- XUE, T.L.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth promoting effect of selenium on senescing lettuce. **Plant and Soil**, v.237, p.55-61, 2000.

- YANG, X.; BALIGAR, V.C.; MARTENS, D.C.; CLARK, R.B. Plant tolerance to nickel toxicity.2. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. **Journal of Plant Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 265-279, 1996.
- YAMAM, M. Nickel especialition in soil and relationship with its concentration in fruits. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.65, n.4, p.545-552, 2000.
- YU, J. W.; WOO, K. C. Correlation between the development of photorespiration and the change in activities of NH₃ assimilation enzymes in greening oat leaves. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.583-588, 1999.
- YU, Q.; RENGEL, Z. Drought and salinity differentially influence activies of superoxide dismutase in narrow-leafed lupins. **Plant Science**, n.142, p.1-11, 1999.
- ZORNOZA, P.; ROBLES, S.; MARTIN, N. Alleviation of nickel toxicity by ammonium to sunflower plants. **Plant and Soil**, v.208, n.2, p.221-226, 1999.